

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA**



**Determinación Inmunohistoquímica  
de las Proteínas Basales en el PIN de  
Alto Grado y en el Carcinoma de  
Próstata**

**TESIS DOCTORAL**

**Ivette Esperanza Pacheco Díaz**

**Madrid, 2012**



**FRANCISCO JAVIER ALVES FERREIRA, PROFESOR ASOCIADO DEL DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID Y FACULTATIVO ESPECIALISTA DE ÁREA DEL SERVICIO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO LA PAZ DE MADRID,**

**CERTIFICA QUE:** Dña. **Ivette Esperanza Pacheco Díaz**, Licenciada en Medicina, ha realizado bajo mi dirección el trabajo de investigación "**Determinación inmunohistoquímica de las proteínas basales en el PIN de alto grado y en el carcinoma de próstata**", estudio que considero completamente satisfactorio para ser presentado y defendido como Tesis Doctoral en la Universidad Autónoma de Madrid

Lo que firmo en Madrid a 3 de septiembre de 2012

## ***Agradecimientos:***

al **Dr. Javier Alves**, por su calidad humana y entusiasmo y porque, a pesar de sus muchas actividades como patólogo, siempre me atendió y orientó con mucha responsabilidad para culminar esta investigación, sin la especial orientación y dedicación del Dr. Alves nunca se hubiera podido concluir mi doctorado.

al **Dr. Manuel Nistal**, por su magisterio en la patología, siempre amablemente dispuesto a enseñar a cuantos patólogos nos hemos acercado a su microscopio; su permanente generosidad y sus palabras de aliento han permitido realizar este estudio. Los patólogos de Latinoamérica le mostramos una especial gratitud, al permitirnos completar nuestra formación en el Departamento de Anatomía Patológica del Hospital La Paz de Madrid.

al **Dr. David Hardisson**, por su encomiable capacidad de transmitir a los patólogos latinoamericanos sus conocimientos científicos, y por su permanente ayuda material y humana para culminar el doctorado en la UAM.

al **Dr. Javier Regadera**, por ser el principal mentor de los patólogos de Latinoamérica cuando realizan estancias formativas en Madrid; su enérgico estímulo y dedicación en los momentos de dificultades y desilusión y, a la vez, su ternura y paciencia hacen que el loable fondo de sus intenciones le conviertan en una de la personas más queridas de los patólogos de Latinoamérica.

## ***Dedicatoria:***

a mi esposo **Hugo Arguello**, por su amor incondicional y paciencia, y por no perder la fe en que culminaría con éxito este nuevo paso en mi vida profesional, compartiendo con él sus conocimientos en patología; además por comprenderme y siempre apoyarme humanamente cuando lo necesitaba para poder seguir adelante durante estas investigaciones.

a mi madre **Luz Esperanza**, quien se esforzó en darme la mejor educación que me podía brindar, que me apoyó para ser médico y patóloga; su constante apoyo emocional en los momentos difíciles y en las decisiones arriesgadas me ha facilitado iniciar nuevos caminos que me han permitido crecer como profesional y persona. Gracias madre por ese incondicional amor que me han permitido alcanzar estos logros.

a mi nana **Elisa**, quien con su amor y dedicación contribuyó a mi formación, sacrificando aún su juventud; mis sincera gratitud por acompañar a mi madre durante toda su vida, en la conducción de mi persona como ser humano y profesional. Hoy, aún en mi ausencia, sigue a la par de mi madre, como la compañera inseparable de ella.

al **Hospital Militar Escuela ``Dr. Alejandro Dávila Bolaños``** de Nicaragua y al **Hospital Infantil de Nicaragua ``Manuel de Jesús Rivera``** de Managua, que me abrieron las puertas para ejercer mi profesión como patóloga y de este modo poder participar en el bienestar sanitario de los nicaragüenses.

a **Nicaragua**, este sufrido y bello país, a sus gentes y a mi nueva familia y amigos que me ha acogido en sus vidas con amor, en esta mi segunda patria.

## ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN</b>	7
FACTORES DE RIESGO DEL CÁNCER DE PRÓSTATA	8
JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO	11
EMBRIOLOGÍA E HISTOLOGÍA DE LA PRÓSTATA HUMANA	12
INMUNOFENOTIPOS EPITELIALES Y NO EPITELIALES DE LA PRÓSTATA	14
CÉLULAS MADRE EN LA PRÓSTATA Y SU RELACIÓN CON EL CÁNCER	18
<i>Localización y Función de las Células Madre</i>	18
<i>El Cáncer y las Células Madre Cancerosas</i>	19
<i>Las Células Madre y la Resistencia a la Terapia</i>	20
NEOPLASIA INTRAEPITELIAL PROSTÁTICA Y CÁNCER	21
CARACTERÍSTICAS INMUNOHISTOQUÍMICAS DEL PIN DE ALTO GRADO Y CÁNCER DE PRÓSTATA	23
VARIEDADES HISTOLÓGICAS DEL CÁNCER DE PRÓSTATA	26
ESCALA GLEASON	27
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	29
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	31
SELECCIÓN DEL MATERIAL DE ESTUDIO	32
MÉTODOS INMUNOHISTOQUÍMICOS	35
INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS	37
ESTUDIOS ESTADÍSTICOS	38
<b>RESULTADOS</b>	41
I DATOS DE LOS PACIENTES	42
1. Pacientes con Gleason 6 (3+3)	42
2. Pacientes con Gleason 7 (3+4 / 4+3)	44
3. Pacientes con Gleason 8 (4+4 / 5+3 / 3+5) y Gleason 9 (4+5 / 5+4)	47
II DETERMINACIÓN DE LAS PROTEÍNAS BASALES: BCL-2, CK19 KI-67	50
1. Expresión Inmunohistoquímica de Bcl-2	50
2. Expresión Inmunohistoquímica de CK19	51
3. Expresión Inmunohistoquímica de Ki-67	57
4. Determinación de la Expresión del Receptor de Andrógenos	59
5. Determinación de la Proteína p27	63

---

<b>DISCUSIÓN</b>	67
CATEGORÍA I: FACTORES PRONÓSTICOS DE RUTINA	69
<i>Patrón Gleason, Estadío TNM y Niveles de PSA Pre-operatorios</i>	69
CATEGORÍA II: FACTORES PRONÓSTICOS RECOMENDADOS A PESAR DE DATOS INCOMPLETOS	74
<i>Tipo Histológico</i>	74
CATEGORÍA III: FACTORES PRONÓSTICOS NO RECOMENDADOS	75
<i>Marcadores Basales: Bcl-2, citoqueratina 19</i>	75
<i>Marcadores de Proliferación: Ki-67, Índice de Proliferación</i>	78
<i>Receptor de Andrógenos</i>	80
<i>Marcadores de Apoptosis: Expresión Nuclear de Proteína p27</i>	82
<b>CONCLUSIONES</b>	84
<b>RESUMEN</b>	87
<b>SUMMARY</b>	90
<b>REFERENCIAS</b>	93

## INTRODUCCIÓN

El cáncer de próstata se considera el sexto cáncer más común en el mundo y el más común, en los Estados Unidos y otros países industrializados, después del cáncer de la piel de tipo no melanocítico<sup>64</sup>; este cáncer junto con el cáncer de pulmón y colon son las neoplasias malignas más frecuentes en el hombre, constituyendo una de las principales causas de muerte en los mismos<sup>21, 62, 64, 109,143</sup>. Se caracteriza por ser un tumor multifocal, no clonal y heterogéneo, localizado en la zona periférica de la próstata (70%)<sup>143</sup>.

Su incidencia y mortalidad aumenta en las poblaciones masculinas que migran de países de bajo riesgo a países de alto riesgo, por lo cual se le considera un tumor heterogéneo, donde algunos factores de comportamiento humano juegan un papel importante en su apareamiento<sup>64</sup>.

## FACTORES DE RIESGO DEL CÁNCER DE PRÓSTATA

Entre los factores de riesgo más importantes que podemos mencionar para el desarrollo de cáncer de próstata tenemos: la edad, la presencia de andrógenos; seguidos por los factores dietéticos, la predisposición familiar y los procesos inflamatorios prostáticos<sup>64,141</sup>. En los últimos años el componente hereditario ha sido identificado y está relacionado con dicho cáncer<sup>141</sup>.

Se consideran a los siguientes factores de riesgo no modificables:<sup>64</sup>

**Edad:** el cáncer de próstata aumenta su incidencia con la edad; de manera que los hombres entre los 40-44 años tienen una incidencia de 9.2/100,000 hombres, y entre los 70-74 la incidencia aumenta a 984.8/100,000 hombres, luego de este último intervalo de edad la incidencia disminuye ligeramente. Así, el riesgo de cáncer de próstata para un hombre a los 50 años es de 42% y su riesgo de morir del mismo es del 3%.

**Raza y ubicación geográfica:** la incidencia es mayor en los países de Europa central y del norte comparado con la de los países del sur y del este. En el 2008 la incidencia en toda Europa fue de 93.4/100,000 (siendo de 27.7/100,000 en Ucrania y 183.1/100,000 en Irlanda). En Estados Unidos es varias veces más alta que en Japón, y los Afroamericanos tiene 1.6 veces más riesgo de desarrollar este cáncer comparado con los Caucásicos



americanos. El riesgo también se modifica con la migración, japoneses que migran a Hawái tienen un riesgo intermedio entre los japoneses en Japón y los Caucásicos americanos.

El riesgo e incidencia ha aumentado en las últimas dos décadas debido al incremento en la determinación del antígeno prostático específico (PSA) como método para la detección temprana del cáncer de próstata. De manera, que en el 2001, alrededor del 75% de los hombres en los Estados Unidos y de 50 o más años, se habían realizado al menos una vez la determinación del PSA.

Otros factores de riesgo que se encuentran asociados al cáncer de próstata son <sup>64</sup>:

**Índice de masa corporal:** se ha demostrado una asociación débil entre el apareamiento del cáncer de próstata y la obesidad, pero se ha demostrado que se encuentra relacionada con enfermedad avanzada, lo cual indica la existencia de mecanismos complejos biológicos subyacentes entre la adiposidad y el cáncer de próstata. La hipótesis más aceptada es que se encuentra relacionada al imbalance de varias perturbaciones metabólicas y hormonales.

**Diabetes Mellitus:** algunos estudios indican que individuos con Diabetes Mellitus tipo 2 se caracterizan por hiperinsulinemia, lo cual aumenta el riesgo de cáncer de próstata a través de la promoción del crecimiento de las células tumorales; pero por otro lado otros han encontrado una relación inversa, por lo que todavía la relación entre ambas patologías es de tipo especulativa.

**Actividad física:** en cuanto a la actividad física todavía no hay nada concluyente, ya que se han encontrado asociaciones positivas y negativas. A pesar de ello la actividad física elevada se encuentra más ligeramente asociada a enfermedad localizada que a la progresiva. El probable efecto positivo de la actividad física puede deberse a aumento de los mecanismos de defensa antioxidantes y la función inmune, prevención de la inflamación crónica y la obesidad; mientras que los efectos negativos pueden estar relacionados a la estimulación de ciertos factores de crecimiento y hormonas (insulina y vitamina D).

**Drogas antiinflamatorias no esteroideas:** la inflamación crónica está involucrada en el desarrollo del cáncer de próstata, por lo que los antiinflamatorios no esteroideos (AINES) pueden jugar un rol en la prevención del cáncer inhibiendo la actividad de las enzimas ciclooxigenasas.

**Comportamiento sexual y enfermedades de transmisión sexual (ETS):** se ha encontrado asociaciones positivas entre la historia de ETS (gonorrea y sífilis) y el riesgo del cáncer de próstata. Un estudio reciente ha demostrado un incremento en el riesgo en hombres Latinos que viven en los Estados Unidos con historia de gonorrea. En un estudio comparativo entre poblaciones se encontró que el riesgo es mayor en hombre Latinos nacidos fuera de los Estados Unidos (1.87%) que en los Latinos nacidos en los Estados Unidos (1.15%), lo cual se debe probablemente a que éstos últimos reciben los tratamientos adecuados en el momento oportuno, disminuyendo el tiempo de infección. La *Trichomonas vaginalis* se ha encontrado en varios estudios asociada a cáncer de próstata, particularmente a enfermedad avanzada y fatal; este agente infeccioso suele ser asintomático en los hombres, y si es persistente posiblemente causa inflamación crónica de la próstata.

En cuanto al comportamiento sexual, el incremento en las ETS está asociado a un gran número de parejas sexuales y por tanto a niveles altos de testosterona circulante; aunque también se ha encontrado el efecto protector a mayor número de eyaculaciones lo cual permite la eliminación de químicos carcinogénicos y toxinas provenientes de la próstata.

**Fumar:** a este factor se le ha atribuido cerca del 30% de asociación a todos los cánceres mundiales, pero no se ha considerado relacionado como factor de riesgo para el cáncer de próstata; pero se encuentra relacionado con enfermedad más agresiva.

**Factores dietéticos:** actualmente se está estudiando los efectos protectores de algunos alimentos y suplementos vitamínicos relacionados al apareamiento y progresión del cáncer. Entre ellos tenemos: frutas y vegetales (tomates), productos de la soya y sus derivados, pescado, selenio, vitamina E, alcohol, té verde y café, consumo de carnes rojas. De todos los anteriores los que de alguna manera se encuentran asociados a mayor riesgo o enfermedad agresiva son: carnes rojas y calcio. En los hombres asiáticos que tienen la menor

incidencia de cáncer de próstata en el mundo se cree que los principales factores dietéticos asociados es el consumo de té verde y productos de la soya. A pesar de los muchos estudios realizados todavía hay mucho que explorar para utilizar o evitar ciertos alimentos por su asociación a este cáncer.

## **JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO**

El número de cáncer de próstata encontrado de manera accidental en autopsias, en pacientes donde han permanecido asintomáticos y no son la causa de muerte, sugiere que cuando son pequeños y localizables estos tumores pueden permanecer no identificables por muchos años mientras progresa la enfermedad a clínicamente significativa<sup>64</sup>.

A pesar de los avances en la detección temprana del cáncer de próstata y de la instauración de la terapia de deprivación andrógena (TDA), se ha observado que existe una cantidad considerable de pacientes con enfermedad avanzada o metastásica que inicialmente responden a la TDA pero que se vuelven resistentes a la misma, y los andrógenos producidos por la glándula suprarrenal y los probablemente producidos por la próstata se piensa que restauran los receptores de andrógenos en algunas células de manera que amplifican la expresión del receptor o alteran la función corepresor-coactivador, activando nuevamente la actividad neoplásica<sup>21,62</sup>.

Se ha propuesto que existe un grupo de tumores, entre ellos el de próstata que contienen un cierto tipo de célula que actúa como célula madre, que se caracteriza por la capacidad ilimitada de autogeneración, tasa de baja proliferación y la habilidad de diferenciarse en ciertas células tumorales proliferantes<sup>18,20,62,109,126,130,131</sup>; razón por la cual se ha dicho que tratar a las células tumorales ya desarrolladas no es suficiente, sino que deben desarrollarse métodos de diagnóstico y tratamientos dirigidos a identificar y erradicar a estas células madres tumorales que son las responsables de la perpetuación del cáncer a través de su resistencia al TDA<sup>20-21,57-58,62,131</sup>.

Por tanto una de las mayores limitantes es la falta de identificación de la célula que origina y mantiene al epitelio prostático normal y al carcinoma prostático, con el

desconocimiento de los mecanismos fisiológicos y patológicos de los mismos<sup>20-21,57-58, 62,130-132</sup>.

## EMBRIOLOGÍA E HISTOLOGÍA DE LA PRÓSTATA HUMANA

La próstata normal aparece en el desarrollo temprano embrionario como una condensación de mesénquima a lo largo del curso de la uretra pélvica. Alrededor de la semana 10 de gestación las yemas epiteliales comienzan su proceso de ramificación principalmente desde las paredes posteriores y talvez las laterales del segmento uretral distal hacia el mesénquima condensado. Este programa de desarrollo es activado por andrógenos secretados por el testículo fetal. Sin embargo, al nacimiento el tamaño de la próstata es menor de 1 cm. La próstata no es expuesta nuevamente a estimulación hormonal hasta la pubertad y alcanza su desarrollo completo alrededor de los 20 años, donde su tamaño normal es cerca de 4.5cms de ancho, de 3.5 a 4.0 cms. de largo y 3.0 cms de grosor. Algunos autores mencionan que más allá de los 30 años ya podemos encontrar signos de alteraciones de la arquitectura normal, y que para los 40 años histológicamente se encontrarán áreas de atrofia focal, relacionadas con inflamación, y que irán aumentando a medida aumente la edad, por lo que debe serse rigurosos con los criterios de diagnóstico de cáncer debido a cierta semejanza histológica<sup>62, 126</sup>.

La próstata es un órgano compuesto hecho de componentes glandulares y no glandulares. Los tejidos no glandulares son el esfínter preprostático, el esfínter estriado, el estroma fibromuscular anterior y la cápsula prostática. Mientras que el componente glandular está constituido por acinos de diferentes formas y tamaños tapizados por epitelio columnar secretor que varía sus características inmunohistoquímicas, a lo largo de la vida y de los diferentes procesos biológicos benignos, premalignos , y malignos que pueda sufrir la próstata. Así, desde la semana 20 de gestación hasta la pubertad, los acinos y ductos prostáticos están tapizados por múltiples capas de epitelio inmaduro; ya en la pubertad este epitelio inmaduro se diferencia en un epitelio de doble capa constituido por células basales cuboidales periféricas y células secretoras cuboidales internas. Las células secretoras están separadas de la membrana basal y del estroma por las células basales, que al igual que las secretoras tienen sus propias características inmunohistoquímicas, pero que además tienen

la función de ser el compartimento proliferativo del epitelio prostático, las cuales normalmente se dividen y maduran en células secretoras. Así podemos decir, que en una próstata normal podemos discernir dentro del epitelio prostático normal y maduro tres tipos de células: basales, secretoras lumbinales y neuroendocrinas<sup>62, 126</sup>.

Las células lumbinales o glandulares constituyen el compartimiento exocrino, de manera que secretan antígeno prostático (PSA) y fosfatasa ácida prostática (PAP) al lumen glandular; además, son las células finales de la diferenciación del epitelio y expresan altos niveles de receptor de andrógeno (RA) y dependen de los andrógenos para su supervivencia. Las células basales varían su apariencia de pequeñas planas a cuboidales, expresan niveles bajos o indetectables de RA y son independientes de los andrógenos para su supervivencia; además, expresan receptores de estrógenos y bajo terapia de estrógenos proliferan. Y el tercer grupo células, las neuroendocrinas, también descansan en el compartimiento basal y contienen serotonina y hormona estimulante de la tiroides, y son insensibles a los andrógenos<sup>62,126</sup>.

El desarrollo prostático es dependiente de la interacción epitelio-mesenquimal, y su interacción con los andrógenos, siendo el resultado final la diferenciación de tejido prostático maduro en el cual el epitelio expresa fenotipo altamente diferenciado secretor, y el mesénquima se convierte en estroma prostático maduro compuesto principalmente por células de músculo liso<sup>23,62,126</sup>.

Aunque la próstata es primariamente considerada como un blanco androgénico, es también un órgano blanco estrogénico. Los estrógenos exógenos y endógenos son capaces de generar metaplasia escamosa de la próstata. Así, varios estudios han demostrado el importante rol de las hormonas esteroideas en la carcinogénesis prostática con las siguientes observaciones:<sup>23</sup> El cáncer de próstata no ocurre en eunucos castrados tempranamente en la vida y dos especies son susceptibles al cáncer de próstata: el hombre y los perros. De hecho, la secreción de testosterona y sus niveles plasmáticos disminuyen con la edad, mientras que los niveles de estradiol libre plasmático permanece constante o aumenta durante el envejecimiento cuando el cáncer de próstata se desarrolla y se diagnóstica.

## INMUNOFENOTIPOS EPITELIALES Y NO EPITELIALES DE LA PRÓSTATA.

El epitelio prostático adulto como hemos dicho antes está constituido por dos tipos de células, pero desde el punto inmunofenotípico podemos agregar otros dos grupos. Así tenemos, células con las siguientes características:

**Células basales:** que constituyen el compartimento proliferativo y que se caracterizan por una alta expresión de p63, citoqueratinas 5/6 y 14, factor antiapoptótico Bcl2 y factor de crecimiento epidérmico (EGFR)<sup>21, 65,131</sup>. Mientras que tienen una baja expresión de RA, PSA, y citoqueratinas 8 y 18<sup>65, 131,142</sup>.

**Células luminales:** que expresa proteínas secretoras como el PSA, RA, citoqueratina 8 y 18, y que carece de la expresión de marcadores basales como p63, citoqueratinas 5/6 y 14<sup>65,131</sup>.

**Células intermedias luminales:** con características inmunofenotípicas intermedias entre células basales y luminales, que han sido demostradas *in vivo* y *in vitro*, y que expresan altos niveles de citoqueratina 5 y 18. Se ha propuesto que estas células son precursoras de las células malignas, pero todavía no está bien definido su rol<sup>65, 132</sup>.

**Células intermedias basales:** que expresan fuertemente citoqueratina 5, pero sin expresar la citoqueratina 14<sup>65,132</sup>.

Aproximadamente el 70% de toda la actividad proliferativa en la próstata humana se encuentra en la capa de células basales y a diferencia de lo que podría creerse, el epitelio glandular atrófico tiene también una actividad proliferativa considerable, de manera que expresa Bcl2 y altos niveles de citoqueratina 8/18, con bajos a moderados niveles de RA y PSA, y niveles significativos de Ki67 luminal<sup>65, 132</sup>.

Estas células intermedias, también llamadas células transitorias amplificadas, son poco frecuentes en la próstata normal, pero pueden incrementarse en varias condiciones como atrofia inflamatoria proliferativa y tejidos previamente expuestos a bloqueo androgénico<sup>18</sup>. Algunos estudios incluso proponen que las células basales intermedias serían las encargadas

de originar la hiperplasia prostática benigna, y que las células secretoras intermedias darían origen a la neoplasia epitelial prostática y el carcinoma<sup>65, 132,143</sup>.

De otra parte, se han comparado las características inmunofenotípicas entre la próstata adulta y la fetal, y los resultados han sido los siguientes<sup>65</sup>:

La expresión de **citoqueratina 5/6 y p63** se encontró en las yemas epiteliales sólidas y las células basales tanto en la próstata fetal como la adulta, pero no en las lumbinales.

La expresión de **citoqueratina 19** se observó en todas las células epiteliales fetales, pero fue restringido al compartimento basal en la glándula adulta; aunque según otros estudios puede expresarse también en algunas lumbinales, siendo consideradas como las células nexo entre ambas células<sup>53</sup>.

La expresión de **citoqueratina 18** fue intensa en todas las células de las yemas epiteliales y en la glándula fetal distal, pero disminuyó considerablemente en el compartimento basal de la glándula fetal proximal y en la glándula adulta.

La expresión del **Receptor de Andr6genos** fue positiva 6nicamente en las células fetales donde se encontr6 compartimento luminal de las gl6ndulas proximales, mientras que la expresi6n en la gl6ndula adulta ocurre de una forma difusa y fuerte en las zonas lumbinales.

La expresi6n de **EGFR y Bcl2** no modificaron su patr6n, fueron positivas en las yemas s6lidas y c6lulas basales de gl6ndulas adultas y fetales. Mientras que fueron difusamente positivas en las c6lulas lumbinales de los ductos fetales distales, focalmente en los ductos proximales y negativa en la gl6ndula adulta.

La expresi6n de **p27 nuclear** estuvo ausente en todas las c6lulas epiteliales fetales pr6státicas, mientras que en las c6lulas adultas fueron difusamente positivas en el compartimento luminal y focal en el compartimento basal.

La expresi6n de **Ki67** vari6 de 10-45% en las yemas fetales, mientras que en las gl6ndulas inmaduras bajo de 6-17%, lo cual indica la disminuci6n en la proliferaci6n de esos

tejidos, aunque células proliferativas se encontraron tanto en las células basales y lumbinales de glándulas canalizadas. Mientras que en la glándula adulta la tasa de proliferación epitelial fue siempre menor del 5% y estuvo restringida al compartimento basal.

Se piensa que la expresión de la citoqueratina 19 identifica una población celular en proceso de diferenciación hacia células lumbinales, y se ha visto que al final se pierde cuando la célula luminal está bien diferenciada<sup>65, 132,143</sup>.

Los factores antiapoptóticos **Bcl2** y **EGFR** mostraron estar presentes en las células basales y se expresaban poco durante la diferenciación y no se expresaban en las células lumbinales adultas prostáticas normales<sup>65</sup>. El Bcl2 es un proto-oncogen que actualmente está relacionado con el gen involucrado en la regulación de la muerte celular programada, por inhibición de la apoptosis<sup>11</sup>. El producto del gen Bcl2 es un potente inhibidor de la apoptosis celular, y su expresión está asociada a un amplio rango de cánceres humanos (células hematopoyéticas, tejidos epiteliales y mesenquimales)<sup>11</sup>. El Bcl2 está predominantemente expresado en células madres y compartimentos de proliferación que requieren la protección del Bcl2 en contra de la apoptosis, para asegurar la supervivencia del epitelio entero<sup>11</sup>.

El p27, inhibidor de la cinasa dependiente de ciclina, se ha dicho que está implicado en el arresto celular, y un incremento de su expresión se cree que le indica a la célula que salga del ciclo celular. Se ha sugerido que la disminución en su expresión puede contribuir al desarrollo de malignidades humanas debido a pérdida de un mecanismo crítico antiproliferativo<sup>11</sup>. En la próstata adulta fue expresado en todas las células del compartimento luminal y la mayoría de las subpoblación basal, su expresión disminuida como veremos más adelante ocurre en la mayoría de carcinomas prostáticos, en las neoplasias epiteliales prostáticas de alto grado (PIN de alto grado) y en ciertas condiciones pretumorales como la atrofia inflamatoria proliferativa<sup>65</sup>.

Por tanto el perfil encontrado en las células fetales (citoqueratina18-19, EGFR y Bcl2 todos positivos y la carencia de p27) indica que son un blanco potencial para la transformación neoplásica, y que es raro encontrarlas en la próstata normal. Por tanto, su análisis y búsqueda puede hacernos llegar a entender la carcinogénesis prostática<sup>65, 132</sup>.



En la siguiente tabla 1 podemos apreciar la expresión proteica de los diferentes tipos epiteliales de la próstata adulta y la fetal según los estudios anteriores<sup>65, 132,143</sup>.

**Tabla 1.** Expresión proteica comparativa entre los diferentes tipos epiteliales de la próstata adulta y fetal

Expresión Proteica	Próstata Adulta				Próstata Fetal	
	Basal	Basal intermedia	Secretoria Intermedia	Madura Secretora	Yema Epitelial	Basal
p <sup>63</sup>	++	++	---	---	++	++
P <sup>27</sup> nuclear	--/+	NSE	NSE	+/-	--	--
Ck <sup>14</sup>	++	---	---	---	NSE	NSE
Ck <sup>5/6</sup>	++	++	++	---	++	++
Ck <sup>8</sup>	+	+	+	++	NSE	NSE
Ck <sup>18</sup>	+	+	+	++	++	+
Ck <sup>19</sup>	++	--	--	--	++	++
RA	--/+	--/++	+/-	++	--/+	--
EGFR y Bcl2	++	NSE	NSE	---	++	++
Ki67 (% actividad)	Menor 5%	---	---	---	10-45%	

++: tinción homogénea fuerte; +: tinción homogénea débil; +/-: tinción heterogénea fuerte a débil; --/+ : tinción heterogénea débil a fuerte; --- no tinción; NSE: no se evaluó.

## **CÉLULAS MADRE EN LA PRÓSTATA Y SU RELACIÓN CON EL CÁNCER**

Las células madres/progenitoras actúan como el sistema de regeneración de células especializadas en muchos órganos que se caracterizan por tener una regeneración normal y funcional constante<sup>52, 143</sup>.

Las células madres se definen por su habilidad de autogeneración y su capacidad de diferenciarse hacia tipos de células especializadas. Las células madres toti y pluripotenciales pueden originar a cualquier tipo de célula madura, mientras que las células madres multipotenciales pueden diferenciarse a células que están relacionadas con un tipo familiar celular. Por tanto, estas células son las responsables del mantenimiento de la homeostasis de muchos tejidos, entre ellos los epitelios de diversos tipos como la epidermis, la mucosa intestinal y las glándulas mamarias entre otros<sup>57,143</sup>.

### ***Localización y Función de las Células Madre***

Las células madres/progenitoras epiteliales de la próstata (CPEP), como hemos dicho anteriormente, se ha dicho que se encuentran localizadas en la capa basal del epitelio estratificado prostático, aunque sólo recientemente varios marcadores para su localización y marcación han sido utilizados<sup>57,62,131,143</sup>. Se ha propuesto que estas células están concentradas en la región proximal de los ductos y que dan lugar a células proliferantes que migran distalmente<sup>62</sup>.

Las CPEP son generalmente quiescentes y residen en una localización especializada conocida como nicho. Los nichos proveen un microambiente que mantiene el balance entre la quiescencia y la auto-regeneración de esta población celular. El mecanismo por el cual el microambiente controla la quiescencia y la activación de este fenotipo primitivo es pobremente comprendido, particularmente para el tejido adulto<sup>62</sup>. En la próstata adulta, las células madres, como lo hemos dicho anteriormente, permanecen en la membrana basal, donde están ancladas por la expresión alta de integrinas<sup>62</sup>.

La principal función de estas CPEP es la preservación del tejido de la glándula dando lugar a células especializadas diferenciadas que corresponden a las células secretoras y

neuroendocrinas. Al ser la próstata un órgano andrógeno dependiente, ante la privación hormonal este disminuirá considerablemente su tamaño, y a través de la apoptosis desaparecerán las células luminales y las basales permanecerán intactas. Este último hecho (las células basales intactas) da lugar al hecho que al readministrar nuevamente los andrógenos, las CPEP darán lugar a células luminales totalmente desarrolladas, permitiendo esto ser la base de la teoría de las CPEP<sup>141</sup>.

La diferenciación de las células epiteliales es un proceso complejo gobernado por la expresión intrínseca de genes que median el proceso de diferenciación y crecimiento<sup>62,141</sup>. Se ha establecido que la interacción epitelio mesénquima también tiene un rol instructivo durante el desarrollo andrógeno inducido de la próstata, lo cual juega un papel importante en el mantenimiento del epitelio de la próstata adulta<sup>23,62,141</sup>. Así, la homeostasia se mantiene por el resultado de la regulación androgénica de la interacción estromal-epitelial; la determinación epitelial como su diferenciación es controlada por una señal mesenquimal inductiva<sup>23, 62,141</sup>.

Estos nichos pueden responder dinámicamente a los requerimientos fisiológicos, como ocurre en cualquier proceso fisiológico. Un desequilibrio en el control del nicho puede contribuir a la enfermedad. La consecuencia biológica de estos cambios es desconocida pero se sospecha que impacta directamente en el control del nicho y este a su vez impacta en la función de las células madres<sup>62</sup>.

En la próstata hay evidencia que la asociación entre el estroma y el cáncer juega un rol importante en el inicio del cáncer<sup>62</sup>.

### ***El Cáncer y las Células Madre Cancerosas***

La carcinogénesis es por definición el proceso donde las células epiteliales benignas adquieren características de malignidad. Todos los epitelios están asociados a tejido conectivo, el cual juega un papel crítico en el desarrollo y diferenciación de los mismos<sup>23</sup>.

El origen celular del cáncer de próstata es aún controversial. Inicialmente se había sugerido que estos cánceres se originaban de células luminales diferenciadas debido a que la

mayoría de las células tumorales expresaban marcadores tumorales luminales específicos y carecían de marcadores de expresión basal. Sin embargo, hay evidencia que soporta el hecho que las células madres cancerosas de la próstata se originan de las células madres normales<sup>62</sup>, entre ellas tenemos que aunque inicialmente la terapia de ablación andrógena es exitosa en los adenocarcinomas primariamente dependientes de andrógenos, en la mayoría de los casos los tumores pueden recurrir como tumores más agresivos y andrógeno independientes<sup>57-58, 62, 124, 136,141</sup>. Estos cánceres avanzados andrógeno-independientes, y células basales (fenotípicamente) pueden ser identificadas en la mayoría de metástasis<sup>62</sup>.

Las mutaciones somáticas que se acumulan en las CPEP en un período de varias décadas pueden afectar los genes involucrados en la regulación del crecimiento, las señales celulares, la diferenciación final y la reparación celular<sup>141</sup>. Así, la edad es el factor de riesgo más significativo en el desarrollo de la malignidad<sup>141</sup>. La frecuencia de mutaciones somáticas se incrementan dramáticamente por los procesos inflamatorios, el cual es un evento común observado en la tumorigénesis prostática y la atrofia glandular<sup>141</sup>. La atrofia glandular inflamatoria (AGI) comparte características moleculares con la neoplasia intraepitelial prostática (PIN), la cual se acepta como la lesión preinvasiva del adenocarcinoma de próstata<sup>130,141</sup>. Así, el evento genético tumor asociado identificado es la fusión de la región no traslocada de 5' del gen regulador de andrógeno TMPRSS2 de los miembros de la familia del factor de transcripción ETS oncogénico, ERG y ETV1 que son comúnmente sobreexpresados en el carcinoma de próstata; por tanto la mutación de estos genes encargados del desarrollo normal de la próstata se piensa que serán los encargados del inicio, progresión y metástasis del cáncer<sup>62, 141</sup>.

### ***Las Células Madre y la Resistencia a la Terapia***

La meta de las terapias existentes, como la ablación andrógena, ha sido erradicar las células tumorales dentro del tumor. Sin embargo, como hemos dicho anteriormente, la población blanco que se caracteriza por ser andrógeno dependiente se vuelve resistente, y mientras el 90% de las células epiteliales luminales sufren apoptosis, las células basales sobreviven como células andrógeno independientes<sup>58, 62</sup>.

Se cree que la terapia de ablación andrógena puede promover la progresión de la enfermedad por la activación de las células quiescentes madres cancerosas que repoblan de células tumorales andrógeno independiente. Por tanto, una de las metas actuales es desarrollar agentes terapéuticos efectivos que puedan seleccionar como blanco a células madres cancerosas, más que a las bien diferenciadas que se encuentran originalmente en el tumor<sup>62</sup>.

Las células madres normales de varios tejidos parecen ser más resistentes a agentes quimioterapéuticos que los tipos celulares maduros. Como dijimos anteriormente, las células madres son quiescentes, de vidas muy largas y están protegidas por sus nichos. Esto significa que están protegidas por su localización y por la carencia de susceptibilidad a los agentes quimioterapéuticos, éstos últimos actúan más frecuentemente sobre células maduras y proliferantes<sup>58, 62, 143</sup>.

## **NEOPLASIA INTRAEPITELIAL PROSTÁTICA Y CÁNCER**

Esta lesión fue descrita por primera vez por McNeal en los años 60, y fue caracterizada más precisamente por McNeal y Bostwick en 1986, donde inicialmente se le llamó displasia intraductal, para luego ser actualmente llamada neoplasia intraepitelial prostática (PIN)<sup>37</sup>.

La incidencia y extensión del PIN parecen incrementarse con la edad del paciente, y se cree que precede en 10 años al apareamiento del cáncer de próstata definitivo. La raza y localización geográfica también influyen la incidencia del PIN. Los hombres Afroamericanos tienen mayor prevalencia de PIN que los Caucásicos alrededor de los 50 a 60 años. Los japoneses que viven en Japón tienen menor incidencia que los que viven en los Estados Unidos, mientras que los asiáticos tienen la tasa más baja detectada de cáncer de próstata.

El PIN consiste en acinos o ductos prostáticos benignos arquitecturalmente tapizados por células atípicas citológicamente. El PIN es subcategorizado actualmente en dos grados: bajo y alto grado, y la distinción entre ambos es el hallazgo de nucléolos prominentes. El grado es asignado basado en las características nucleares de los núcleos periféricos localizados contra la membrana basal<sup>37</sup>.

El PIN de bajo grado consiste en glándulas benignas preexistentes con mínima proliferación epitelial en términos de estratificación nuclear y mínimo agrandamiento nuclear y carecen de nucléolo prominente<sup>37</sup>.

El PIN de alto grado se caracteriza por atipia nuclear y se acompaña frecuentemente de alteraciones arquitecturales. Las glándulas basofílicas están separadas por una cantidad modesta de estroma y tienen un patrón arquitectural característico con glándulas grandes, ramificadas, con papilas en su interior y lúmenes ondulantes. La apariencia basofílica está dada por las siguientes características celulares: agrupamiento, agrandamiento e hiper cromasia, acompañado de citoplasma anfofílico. Los núcleos centrales tienden a tener una apariencia citológica más blanda comparada con los periféricos<sup>37</sup>. Cuatro son los principales patrones de PIN que han sido descritos: en penacho, micropapilar, cribiforme y plano. Otros patrones inusuales son: en anillo de sello, células pequeñas neuroendocrinas, mucinoso, microvacuolado (espumoso), invertido (en decapitación) y PIN con diferenciación escamosa<sup>14,15,89</sup>.

Basados en muchos datos, parece que el PIN de alto grado es un precursor de algunas formas de carcinomas de la próstata, razón por la cual algunos individuos han propuesto que debería llamarse carcinoma in situ. Sin embargo, no podemos asumir que es la lesión precursora universal de los carcinomas de próstata, ya que el 70% de los carcinomas más tempranos carecen del PIN de alto grado; además parece ser una lesión poco frecuente a nivel de la zona de transición. El PIN de alto grado aparece relacionado con los cánceres periféricos y de alto grado<sup>37</sup>.

Actualmente, el término PIN se utiliza para designar a las lesiones de alto grado (grado 2 y 3), ya que el PIN de bajo grado (grado 1) se caracteriza por el alto nivel de variabilidad entre los interobservadores y su limitación en la utilidad clínica<sup>5,14,15,37,48,89</sup>. En los Estados Unidos, en el año 2009, la incidencia total de PIN fue del 9% en promedio (4%-16%), la cual varió de acuerdo a la población de hombres estudiada y al método utilizado para la toma de muestra para diagnóstico trucut (22-45%) y resección transuretral (2.8-33%)<sup>14</sup>.

El promedio de volumen de PIN en próstatas con cáncer es de 1.2 – 1.32 cc, y el volumen aumenta al aumentar el estadio patológico, márgenes quirúrgicos comprometidos e invasión perineural<sup>14,15</sup>.

Se describe invasión estromal temprana en el PIN, lo cual es evidencia de carcinoma, y ocurre en acinos con PIN con evaginaciones y disrupción de la membrana basal, esto último se considera microinvación en el 2% de todos los campos de alto poder, sin importar el patrón arquitectural<sup>14,15</sup>.

El PIN y el cáncer son usualmente multicéntricos y periféricos. El PIN es multicéntrico en el 72% de las prostatectomías radicales con cáncer, el 63% periférico, el 7% en la zona de transición y el 2% se encuentra en todas las zonas<sup>14,15</sup>.

Los diagnósticos diferenciales del PIN son: hiperplasia de células basales, epitelio benigno, PIN de bajo grado, cambios reactivos, hiperplasia cribiforme, atrofia e hiperplasia post-atrofica<sup>14,15</sup>.

### ***Características Inmunohistoquímicas del PIN de Alto Grado y Cáncer de Próstata***

Las **citoqueratinas de alto peso molecular**, detectadas mediante técnicas de inmunohistoquímica permiten detectar la presencia o ausencia de células basales, lo cual es importante en algunos casos para confirmar el diagnóstico del PIN. El anticuerpo más comúnmente usado para etiquetar a las células basales es la citoqueratina de alto peso molecular (ck 5/6), la cual es inmunoreactiva en glándulas benignas y está localizada en el citoplasma de las células basales y es negativa en el cáncer de próstata. Más recientemente, se ha introducido el anticuerpo p63 para etiquetar el núcleo de las células basales en las lesiones prostáticas benignas<sup>37</sup>.

En las lesiones de PIN de alto grado se conserva el patrón de la ck 5/6 en una distribución basal, pero debido a que hemos mencionado antes que son lesiones precursoras de cáncer y el interés de saber en qué momento adquieren sus características proliferantes se han realizado estudios que evalúan la proliferación celular de las mismas (bcl-2) y el estatus de receptor de andrógeno (RA)<sup>11,37</sup>.

El **proto-oncogen Bcl-2** es actualmente uno de los más importantes genes involucrados en la regulación de la muerte celular programada, por inhibición de la apoptosis<sup>11,26</sup>. El producto del gen Bcl-2 es un potente inhibidor de la muerte celular programada, y se expresa en un rango amplio de células de los tejidos hematopoyéticos, epiteliales, mesenquimales y el cáncer. Se expresa predominantemente en células madres y compartimentos proliferantes que requieren la protección del Bcl-2 para asegurar la supervivencia del epitelio completo.

Datos previos han mostrado que el Bcl-2 está confinado a la capa basal del epitelio prostático (Tabla 1) , pero en estudios actuales también se reportan altos niveles en los lúmenes de células secretoras hiperplásicas<sup>11</sup>.

Las células lumbinales secretoras y las células basales tienen diferentes requerimientos hormonales y el involucramiento es diferente en el crecimiento normal y anormal de la próstata. Las células lumbinales requieren andrógenos circulantes para su continuo mantenimiento y sufren apoptosis al ser deprivadas de testosterona; mientras que las células basales son resistentes a la muerte celular dependiente de andrógenos<sup>11</sup>.

Por otro lado los procesos mediados por el Bcl-2 también han sido implicados en la tumorigenicidad epitelial. Se ha observado su sobreexpresión en adenomas colorrectales, en la neoplasia intraepitelial cervical (NIC) y otras lesiones precancerosas sugiriendo su rol en algunos los estadios tempranos de carcinogénesis<sup>11</sup>.

El PIN de alto grado que representa a la lesión precursora del cáncer periférico y representa el mayor blanco de quimoprevención del cáncer de próstata<sup>11</sup>.

Según algunos estudios el Bcl-2 es fuertemente reactivo en las células basales de las glándulas normales e hiperplásicas de la zona periférica y transicional, pero el epitelio secretor carece de inmunoreactividad en las mismas zonas<sup>11</sup>. En el PIN de alto grado la inmunoreactividad es variable, siempre observándose en las células basales, pero en un 22% se extendía a las células secretoras lumbinales, en una intensidad variable; mientras que en el cáncer careció de inmunoreactividad detectable<sup>11</sup>.



El **Ki-67** y el **MIB-1** ambos marcadores de proliferación celular, son positivos en un 81% y 77% para etiquetar las células basales<sup>25</sup>. En cuanto al índice de proliferación (MIB-1), el tejido prostático normal exhibió en las células epiteliales un 77% de inmunoreactividad, correspondiendo a la expresión de Bcl-2, a nivel de las células basales y el 22% restante fue detectado en el epitelio secretor que carecía de inmunoreactividad para el Bcl-2<sup>11</sup>. En el PIN de alto grado la actividad proliferativa fue heterogénea variando de 0-48 células positivas en 10 campos de alto poder; el 98.3% fue detectado en el epitelio secretor luminal, y el restante en las células basales positivas para Bcl-2. Sin encontrar correlación entre la actividad proliferativa y el Bcl-2 de las células proliferativas del PIN de alto grado<sup>11</sup>.

En el cáncer de próstata el índice de proliferación (MIB-1 o Ki-67) parece tener poca información predictiva para el resultado del paciente, cuando se compara con los indicadores tradicionales como el score Gleason y el estadio patológico; sin embargo puede discriminar entre el cáncer órgano-confinado y el metastásico es útil, ya que la elevación de los índices proliferativos indican la progresión de la enfermedad<sup>25</sup>.

El **receptor de andrógenos** tiene una marcada expresión nuclear en el epitelio secretor luminal de las zonas periféricas y transicionales de la próstata, mientras que las células basales fueron débilmente positivas<sup>2</sup>. El mismo patrón presenta las glándulas hiperplásicas<sup>11</sup>. La mayoría de los PIN de alto grado mostraron en las células secretoras lumbales una fuerte positividad nuclear para RA, pero sin estar presente en las células basales<sup>11</sup>. En las lesiones cancerosas se expresó fuertemente el RA nuclear<sup>11</sup>. El RA está presente en el cáncer de próstata antes de la terapia hormonal y después en el cáncer refractario a las hormonas

El **p27 (kip 1)**, **ciclina D3** y el **Ki67** son los marcadores del daño al DNA y la proliferación celular<sup>97</sup>. En los cánceres epiteliales humanos la reducción en los niveles de expresión de p27 es frecuentemente observada en la correlación con la progresión tumoral y la pobre supervivencia<sup>105</sup>.

En los humanos el p27 y los marcadores de envejecimiento estuvieron elevados en el PIN no asociado al cáncer de próstata, pero está disminuido en los PIN asociados al cáncer y en el cáncer de próstata mismo. La sobreexpresión de p27 está relacionada con pérdida de la

polaridad celular, alteraciones arquitecturales y alteraciones de las moléculas de adhesión, y algunos datos sugieren que es el punto que limita la progresión del PIN al cáncer de próstata, ya que la pérdida en su expresión permite la progresión del PIN al cáncer invasivo<sup>105</sup>.

La expresión de p27 es significativamente más alta en la hiperplasia prostática benigna comparada con el cáncer de próstata<sup>97, 105</sup>.

Algunos estudios han correlacionado la expresión de p27 con Ki67 y ciclina D3, de manera que el p27 está pobremente expresado en aquellos tejidos que sobre-expresan el ki67 y ciclina D3, como el cáncer de próstata<sup>97, 105</sup>.

El nivel de p27 es significativamente reducido en los cánceres invasivos comparado con el epitelio benigno. Focos de PIN adyacentes al cáncer invasivo muestran consistentemente reducción en la intensidad de la tinción y el número de células positivas para p27, comparadas con el epitelio benigno. En contraste en los focos de PIN no asociados a cáncer la expresión de p27 fue igual a la del epitelio normal<sup>97, 105</sup>.

## **VARIEDADES HISTOLÓGICAS DEL CÁNCER DE PRÓSTATA**

La gran mayoría de los cánceres prostáticos son adenocarcinomas acinares, de manera que en general podemos dividir, desde el punto histológico, a esta neoplasia en dos grandes grupos: el primero el tipo acinar y el segundo (menor en frecuencia) el tipo no acinar<sup>54</sup>.

Según la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS 2004) las variedades del tipo acinar son: atrófica, psedohiperplásica, espumosa, coloide, en anillo de sello, oncocítica y carcinoma tipo linfoepitelioma. El segundo grupo, de tipo no acinar, que representa únicamente el 5-10% de todos los originados de la próstata, incluye las siguientes variedades histológicas: sarcomatoide, ductal, urotelial, escamoso y carcinoma adenoescamoso, carcinoma de células basales y los tumores neuroendócrinos específicamente los carcinomas de células pequeñas<sup>54</sup>.

Recientemente, se han descrito variantes histológicas que no están presentes en la clasificación OMS de los cánceres de próstata y son las siguientes: el adenocarcinoma like

neoplasia intraepitelial, el carcinoma neuroendocrino de células grandes y el pleomórfico de células gigantes<sup>54</sup>.

Todas las variedades tanto acinar no clásico y los no acinares, son prácticamente tumores raros, que por lo general se presentan junto al patrón clásico acinar. A todos los acinares se les aplica la escala de Gleason, la cual variará, algunos serán Gleason 3 (atrófico, pseudohiperplásico, espumoso, mucinoso), mientras que otros serán Gleason 5 (Células en anillo de sello, carcinosarcoma, el ductal puro). Pero algunos, tanto de variedades acinares como no acinares, no podrán ser clasificados con escala Gleason y se consideraran de alto grado y muy agresivos, entre ellos tenemos: el adenocarcinoma tipo linfioepitelioma, el escamoso, el urotelial, el carcinoma de células pequeñas, el carcinoma de células basales entre otros. Y por otro lado tendremos tumores que podrán estar con áreas clasificables y no clasificables como los adenonescamosos<sup>54</sup>.

## **ESCALA GLEASON**

En 1966 Donald Gleason desarrollo su sistema de graduación para el adenocarcinoma de próstata. Esta clasificación fue definida y ganó aceptación universal en 1974, siendo clasificada como categoría 1, como parámetro pronóstico por el Colegio Americano de Patólogos; dicha escala sufrió algunas modificaciones que fueron recomendadas a la Sociedad de Patología Urológica (ISUP) en el año 2005<sup>27</sup>.

Originalmente, cuatro categorías fueron propuestas para clasificar a estos tumores: muy bien diferenciados, bien diferenciados, moderadamente diferenciados y pobremente diferenciados. Sin embargo, con estudios de seguimiento el Dr. Gleason notó que existían ciertos patrones arquitecturales con cierta significancia pronostica, que inicialmente fueron nueve pero que finalmente definió cinco patrones que se parecen mucho a los que actualmente conocemos<sup>27</sup>.

Se ha enfatizado que la graduación debe realizarse a baja magnificación y que los detalles citológicos no deben contribuir a la hora de realizar el Gleason y su sumatoria<sup>27</sup>.

Gleason desarrolló su sistema de graduación debido a su percepción que muchos de los sistemas carecían de reproductividad; pero su reproducibilidad depende en gran manera del que la interpreta siendo del 70% entre los uro patólogos y disminuyendo al 50% entre los patólogos generales <sup>27</sup>.

La escala Gleason se ha visto que está directamente correlacionada con falla bioquímica, el desarrollo de metástasis, sobrevida seguida de la radioterapia o con otro tratamiento, progresión y curación <sup>23</sup>.

La índice de Gleason es la sumatoria de los dos principales patrones y debe describirse tanto en biopsias por trucut como en prostatectomías. Se ha decidido que para biopsias por trucut patrones 1 y 2 raramente deben ser diagnosticados. Se considera que el patrón 1+1=2 en tumores casi siempre representa hiperplasia adenomatosa atípica <sup>23</sup>.

Actualmente, con los actuales criterios modificados los tumores de índice 6 han disminuido de 48.8% a 22%, mientras que los índice 7 han aumentado de 25.5% a 67.9%.

La relación entre el índice determinado por la biopsia por trucut y el determinado en el espécimen de la prostatectomía radical también ha sido evaluada. Índices de 7 o más, incrementaron de 32 a 46% en los casos de biopsias por trucut y de 53% a 68% en los casos de prostatectomías radicales.

## **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

## **HIPOTESIS**

**PRIMERA:** La expresión de los marcadores basales puede encontrarse en tejidos con cáncer de próstata y la neoplasia intraepitelial prostática.

**SEGUNDA:** El p27 (Kip1) disminuye su expresión a medida que el cáncer de próstata es más indiferenciado, tanto en el PIN de alto grado adyacente a la lesión como en el cáncer mismo.

## **OBJETIVOS**

**PRIMERO:** Determinar la localización de la expresión de proteínas basales (ck19, Bcl-2 y Ki67) en tejidos con cáncer de próstata y PIN de alto grado.

**SEGUNDO:** Determinar la localización de la expresión de receptor de andrógeno en tejidos con cáncer de próstata y PIN de alto grado.

**TERCERO:** Determinar la expresión de p27 en tejidos con cáncer de próstata y PIN de alto grado.

**CUARTO:** Comparar la expresión de las proteínas basales y de p27 en tejidos con cáncer de próstata y PIN de alto grado.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

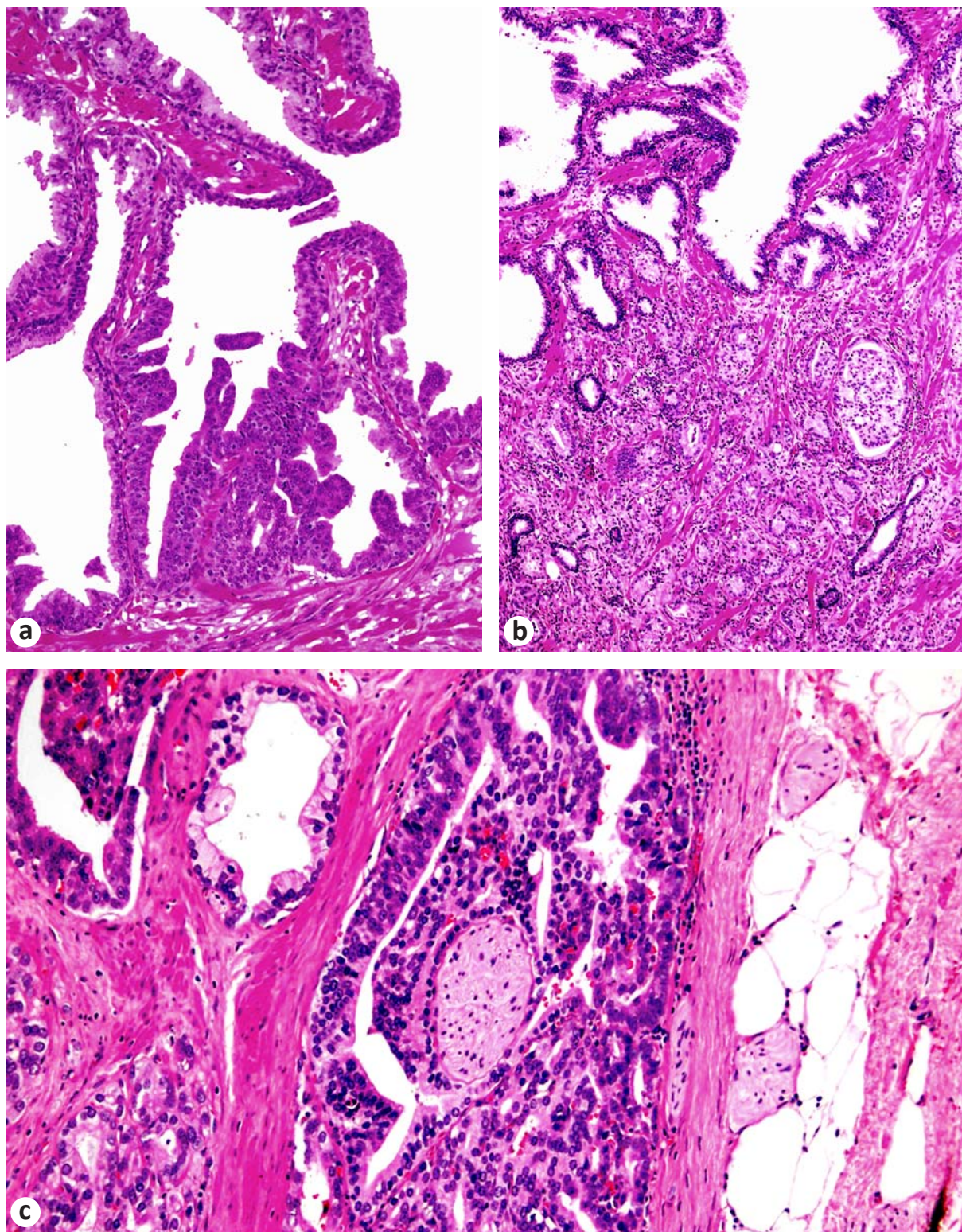
## SELECCIÓN DEL MATERIAL DE ESTUDIO

Para el estudio se seleccionaron al azar de la base de datos del departamento de Anatomía Patológica del Hospital La Paz en Madrid, 44 casos de adenocarcinoma de próstata diagnosticados entre los años 2005 al 2009. Se dividieron los casos en tres grandes grupos de acuerdo al valor de escala de Gleason diagnosticada, de manera que en el primer grupo se encuentra los adenocarcinomas Gleason 6 (3+3) dentro del que se seleccionaron 14 casos ( 3 del año 2005, 4 del año 2006, 2 del año 2007 y 5 del 2009); el segundo grupo comprende los adenocarcinomas Gleason 7 (3+4 o 4+3), dentro del que se seleccionaron 15 casos ( 2 del año 2005, 1 del 2006, 2 del 2007 y 10 del 2009); y el tercer grupo comprende los adenocarcinomas con los Gleason 8 (4+4 o 5+3 o 3+5) y Gleason 9 (4+5 o 5+4) dentro del cual se seleccionaron 15 casos ( 2 del 2005, 2 del 2006, 1 del 2007, 8 del 2008 y 2 del 2009).

Se revisaron todas las láminas pertenecientes a los casos teñidas con hematoxilina y eosina y se escogió de cada caso una lámina que tuviera en la misma muestra áreas de tejido con neoplasia intraepitelial prostática de alto grado (PIN de alto grado) y áreas representativas del tumor y de la escala Gleason a la que pertenecían (20 Gleason 3, 15 Gleason 4 y 9 Gleason 5).

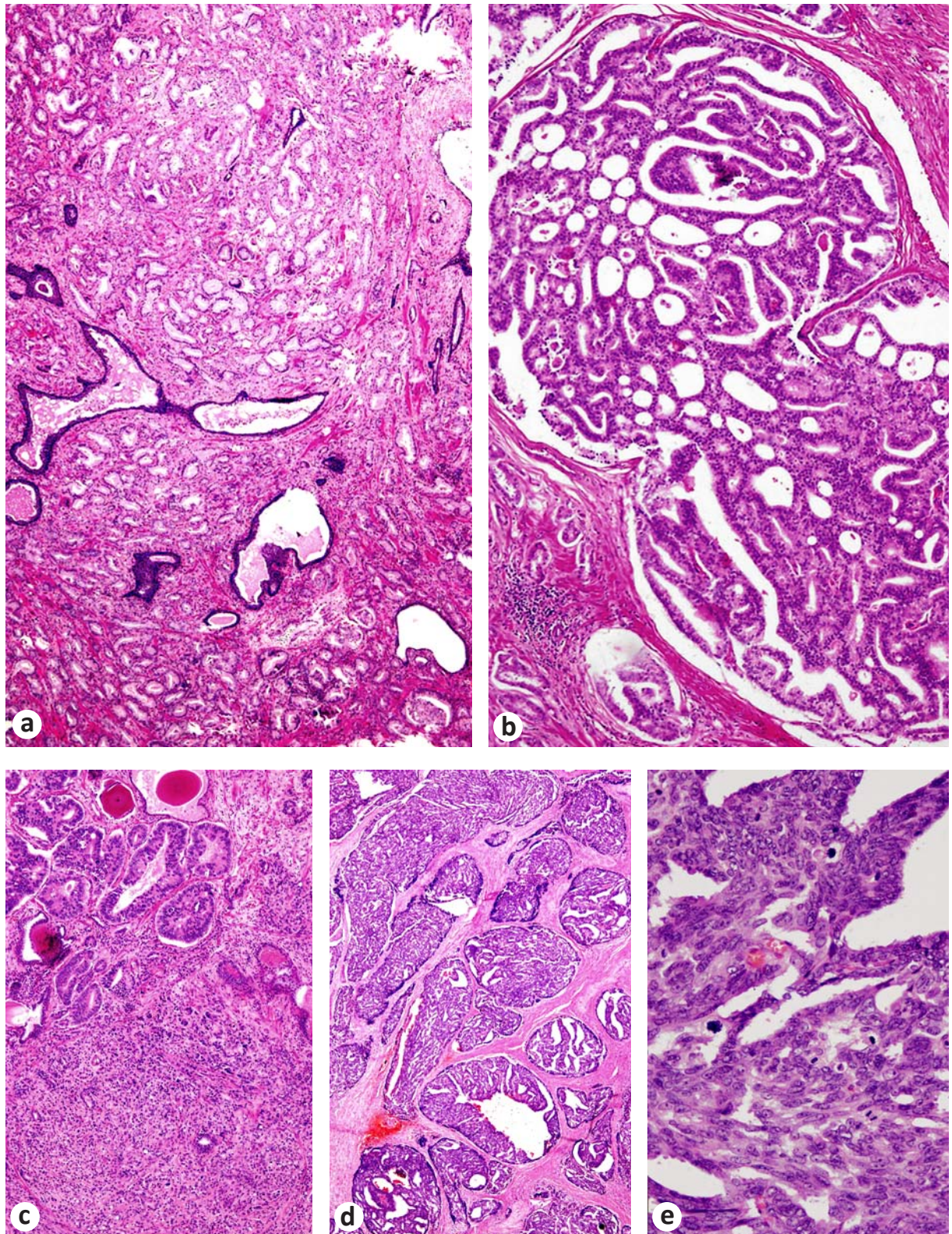
De la lámina seleccionada en cada caso se realizó del bloque de parafina al que le correspondía cinco láminas con cortes a 3 micras de espesor, para realización de inmunohistoquímica y etiquetadas con los siguientes anticuerpos: Oncoproteína Bcl-2 (Bcl-2), Antihumano p27<sup>kip1</sup> (p27), citoqueratina 19(Ck19), Antihumano receptor de andrógenos (RAnd) y Ki-67.





**Fig 1.** **a:** PIN. **b:** Carcinoma infiltrante de próstata y PIN. **c:** Carcinoma de próstata con invasión perineural.





**Fig 2.** Diferentes Grados de Gleason en el carcinoma de próstata. **a:** Grado de Gleason 4+3. **b:** Grado de Gleason 4+4. **c:** Grado de Gleason 4+5. **d, e:** Grado de Gleason 5+4.



## MÉTODOS INMUNOHISTOQUÍMICOS

**Corte y desparafinado** de las muestras: en láminas silanizadas se colocaron los cortes a 3 micras de espesor y se desparafinan durante toda la noche a temperatura constante de 56°C en horno de laboratorio.

**Hidratación:** luego del desparafinado se pasan los tejidos por las siguientes soluciones para su hidratación: Xilol 1 (diez minutos), Xilol 2 (cinco minutos), Alcohol absoluto 1 (tres minutos), Alcohol absoluto 2 (tres minutos), Alcohol 96° (tres minutos), Alcohol 96° (tres minutos), Alcohol 80° (tres minutos) y Alcohol 70° (tres minutos).

**Lavado del material:** se coloca el material en Solución Wash Buffer 10x de Dako (Código S3006), a una dilución de 1:10 con agua destilada (una parte de Wash buffer 10x en nueve partes de agua destilada).

**Potenciador y desenmascarador del antígeno:** para este paso se coloca en el Pt Link a 95°C una dilución 1 en 50 de EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (DM828, código K8004), pH de 9, con agua destilada por 20 minutos, conteniendo las láminas de los siguientes anticuerpos: Bcl-2, Ck19, p27 y RAnd. En el caso del Ki67, siempre se utiliza el Pt Link a 95°C pero con una dilución de 1 en 50 de EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, Low pH (50x) (DM829, código K8005), pH 6.1, con agua destilada por 20 minutos.

**Lavado del material:** lavado con solución EnVision™ FLEX Wash Buffer (20x) (DAKO Código DM831, código K8007) dilución 1:20 con agua destilada.

Colocación de las láminas en el Dako Autostainer Plus para los siguientes pasos:

**Inhibición de la peroxidasa endógena:** con 100 micro litros (µl) de EnVision™ FLEX Peroxidase-Blocking Reagent DM821 Código (listo para usarse) durante cinco minutos.

**Lavado 1:** lavado con 100 µl de solución EnVision™ FLEX Wash Buffer (20x) (DAKO Código DM831, código K8007) dilución 1:20 con agua destilada.

***Anticuerpos Primarios:***

Oncoproteína Bcl-2, anticuerpo monoclonal de ratón- antihumano, (Kit comercial Dako Código IR614 124), pre diluido listo para usarse: 100 µl por 20 minutos.

Citoqueratina 19, anticuerpo monoclonal de ratón- antihumano (Kit comercial Dako Código RCK 108), pre diluido listo para usarse: 100 µl por 20 minutos.

Ki-67, anticuerpo monoclonal de ratón- antihumano (Kit comercial Dako Código MIB-1), pre diluido listo para usarse: 100 µl por 20 minutos.

Receptor de andrógeno, anticuerpo monoclonal de ratón- antihumano, (Dako Código AR 441), dilución 1:50, con EnVision™ FLEX Antibody Diluent (Código K8006 DM830): 100 µl por 20 minutos.

Anticuerpo p27, anticuerpo monoclonal de ratón- antihumano, (Dako Código SX53G8), dilución 1:50, con EnVision™ FLEX Antibody Diluent (Código K8006 DM830): 100 µl por 20 minutos.

**Lavado 2:** lavado con 100 µl de solución EnVision™ FLEX Wash Buffer (20x) (DAKO Código DM831, código K8007) dilución 1:20 con agua destilada.

**Incubación con anticuerpo secundario:** incubación con 100 µl por 20 minutos con EnVision™ FLEX+ Mouse (LINKER) (DAKO K8022), listo para usarse.

**Lavado 3:** lavado con 100 µl de solución EnVision™ FLEX Wash Buffer (20x) (DAKO Código DM831, código K8007) dilución 1:20 con agua destilada.

**Lavado 4:** lavado con 100 µl de solución EnVision™ FLEX Wash Buffer (20x) (DAKO Código DM831, código K8007) dilución 1:20 con agua destilada.

**Revelador:** Se utilizan 200 µl de EnVision™ FLEX DAB+ Chromogen (DAKO Código DM827), listo para usarse.

**Lavado 5:** lavado con 100 µl de solución EnVision™ FLEX Wash Buffer (20x) (DAKO Código DM831, código K8007) dilución 1:20 con agua destilada.

**Contratinción:** con 200 µl por cinco minutos, de EnVision™ FLEX Hematoxylin (DAKO Código K8018), lista para usarse.

**Lavado 6:** lavado con 100 µl de solución EnVision™ FLEX Wash Buffer (20x) (DAKO Código DM831, código K8007) dilución 1:20 con agua destilada.

**Lavado 7:** lavado con 100 µl de solución EnVision™ FLEX Wash Buffer (20x) (DAKO Código DM831, código K8007) dilución 1:20 con agua destilada.

Se sacan las láminas del Dako Autostainer Plus y se realizan los siguientes pasos:

**Lavado 8:** con agua destilada.

**Deshidratación y montaje:** se pasan las láminas tres minutos con agitación por los siguientes líquidos hasta llegar al montaje: alcohol al 70%, alcohol al 80%, alcohol al 96% y alcohol absoluto. Luego se colocan en Xilol y se montan con DPX.

## INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Para la evaluación de los resultados de la inmunohistoquímica de los anticuerpos Bcl-2, Ck19, RA y p27 se utilizó la siguiente escala de valores:

- ++** si el resultado de la tinción fue intenso y casi homogéneo;
- +** si el resultado la tinción fue débil y casi homogéneo;
- +/-** si el resultado de la tinción fue débil a fuerte, en un patrón heterogéneo;
- /+** si el resultado de la tinción fue débil y heterogéneo;
- si el resultado de la tinción fue negativo.

Además, en el caso del PIN de alto grado se evaluó en que células se expresó el anticuerpo, si fue en las células basales o en las células secretoras luminales.

En el caso del Ki-67, se contaron cuantas células son positivas en 10 campos de alto poder (40X), para sacar un promedio entre ellas y luego multiplicarlo por 100 para trabajar

con porcentajes y poder comparar los resultados con otros estudios. Luego se agruparon en tres grandes grupos: índice de proliferación menor o igual al 5%, entre el 5 a 20% y mayor al 20%.

## ESTUDIOS ESTADÍSTICOS

Se evaluarán las siguientes variables para cada grupo de Gleason con formato de Excel calculando el promedio y expresando los resultados en porcentajes:

**Edad:** expresada en años y constatando el promedio, rango de variación y datos agrupados, expresados en porcentaje por grupo:

Menores de 50 años

Entre 50 y 60 años

Entre 60 y 70 años

Mayores de 70 años

**PSA total preoperatorio:** agrupando los casos en tres grandes grupos, expresados en porcentajes por grupo.

Menos de 4 ng/ml

Entre 4 y 10 ng/ml

Entre 10 y 20 ng/ml

Mayor de 20 ng/ml

**Cociente PSA preoperatorio:** expresado en porcentajes por grupo.

Menores o iguales a 0.25

Mayores de 0.25

**Estadio del tumor primario:** expresado en porcentajes por grupo.

pT1a

pT2a

pT2b

pT2c

pT3a

pT3b

pT4

**Estado de los ganglios linfáticos:** expresado en porcentajes por grupo.

pN0

pN1

pNx

**Tipo histológico:** expresado en porcentajes por grupo.

**Grado histológico:**

Grado 1

Grado 2

Grado 3

**Tipo histológico:**

Acinar usual

Otros

**Estado de los márgenes quirúrgicos:** expresado en porcentajes por grupo.

Positivos

Negativos

**Tratamiento con radioterapia y/o quimioterapia:** expresado en porcentajes por grupo.

Si

No

**Estado actual del paciente:** expresado en porcentajes por grupo.

Vivo

Muerto

**Causa de fallecimiento:** expresado en porcentajes por grupo.

Relacionada con el cáncer

No asociada al cáncer

**Neoplasias sincrónicas:** expresado en porcentajes por grupo.

Sí

No

**Tiempo de supervivencia:** tiempo transcurrido desde el diagnóstico al último seguimiento, expresado en porcentajes por grupo.

Menos de 12 meses:

Entre 12 a 24 meses:

Entre 25 a 36 meses:

Entre 37 a 48 meses:

Entre 49 a 60 meses:

Más de 60 meses:



## RESULTADOS

## I DATOS DE LOS PACIENTES

### 1. Pacientes con Gleason 6 (3+3)

Las edades de los pacientes diagnosticados con Gleason 6 variaron entre los 47 y los 71 años, con un promedio de 60.2 años. El 57.2% se encontró con edades comprendidas entre los 60 y 70 años, seguido por el 28.6% que se encontró entre los 50 y 60 años, y sólo el 7.1% correspondió a edades por debajo de los 50 años y por arriba de los 70 años (Tabla 2).

El PSA total preoperatorio varió entre 3.00 ng/dl y 10.88 ng/dl, con un promedio de 5.46 ng/dl. El 71.4% cursó con PSA totales que variaron entre 4 a 10 ng/dl, presentando el 21.5% valores menores de 4 ng/dl, 7.1% valores entre 10 y 20 ng/dl, y ninguno de los pacientes con valores por arriba de los 20 ng/dl. El cociente del PSA libre/PSA total en promedio fue de 0.14, se realizó en 85.7% de los paciente y todos tuvieron valores menores de 0.25, mientras que en el 14.3% de los pacientes no se realizó el PSA libre (Tabla 2).

El estadio tumoral de la neoplasia al momento del diagnóstico correspondió en el 85.5% al pT2c y en ninguno de los casos se valoró estado ganglionar. El 7.1% se encontró en el estadio pT1a y el otro 7.1% en el estadio pT2a. El 100% de los tumores correspondieron al tipo histológico designado como acinar, con grado histológico 2 en el 85.7% de los casos. El 14.3% correspondieron al grado histológico 1 y ninguno al grado histológico 3 (Tabla 2).

Los márgenes quirúrgicos se encontraron positivos en el 21.4% de los casos y negativos en el 78.6%. Ninguno de los pacientes tuvo necesidad de tratamiento con quimioterapia o radioterapia entre el período del diagnóstico y el momento del estudio (Tabla 2).

El tiempo transcurrido entre el momento del diagnóstico y el momento del estudio fue en promedio de 50.86 meses, con intervalos que variaron entre 10 y 88 meses. El 50% de los pacientes estudiados tiene arriba de 60 meses diagnosticados y el 35.7% tiene menos de 36 meses diagnosticados al momento del estudio (Tabla 3).

De todo este grupo de pacientes 92.9% estaban vivos al momento del diagnóstico, y solo el 7.1% está muerto por causas no relacionadas a la neoplasia (hemorragia subaracnoidea) (Tabla 2). Ninguno de los pacientes (100%) presentó tumores sincrónicos ni

al momento del diagnóstico ni a lo largo del tiempo transcurrido entre el momento del diagnóstico y el momento del estudio (Tabla 2).

**Tabla 2.** Características de los 14 pacientes con Índice Gleason 6 (3+3) en prostatectomías radicales realizadas en el Hospital La Paz, Madrid, España.

Adenocarcinoma de Próstata, Gleason 6 (3+3)			
Variable	Nº de Pacientes (%)	Variable	Nº de Pacientes (%)
<b>Edad (Años)</b>		<b>Estado del paciente</b>	
< 50	1 (7.1%)	Vivo	13 (92.9%)
50-60	4 (28.6%)	Muerto	1 (7.1%)
60-70	8 (57.2%)		
>70	1 (7.1%)		
<b>PSA preoperatorio (ng/ml)</b>		<b>Cociente PSA libre/PSA total</b>	
< 4	3 (21.5%)	< 0,25	12 (85.7%)
4-10	10 (71.4%)	≥ 0.25	0
10-20	1 (7.1%)	No realizado	2 (14.3%)
>20	0		
<b>Estadio Tumoral</b>		<b>Estado de los ganglios linfáticos</b>	
pT1a	1 (7.1%)	pN1	0
pT2a	1 (7.1%)	pN0	0
pT2b	0	pNx	0
pT2c	12 (85.8%)		
pT3a	0		
pT3b	0		
pT4	0		
<b>Grado histológico</b>		<b>Tipo Histológico</b>	
Grado 1	2 (14.3%)	Acinar	14 (100%)
Grado 2	12 (85.7%)	No acinar	0
Grado 3	0		
<b>Estado Márgenes</b>		<b>Tratamiento con Rt/QT</b>	
Positivos	3 (21.4%)	Si	0
Negativos	11 (78.6%)	No	14 (100%)
<b>Tumores sincrónicos</b>			
Presentes	0		
Ausentes	14 (100%)		

**Tabla 3.** Tiempo transcurrido entre el diagnóstico y el estudio en los 14 pacientes con Índice Gleason 6 (3+3).

<b>Adenocarcinoma de Próstata, Gleason 6 (3+3)</b>	
<b>Tiempo Transcurrido Entre el Diagnóstico y el Estudio</b>	<b>Nº de Pacientes (%)</b>
Menos de 12 meses	1 (7.1%)
Entre 12 y 24 meses	2 (14.3%)
Entre 25 y 36 meses	2 (14.3%)
Entre 37 y 48 meses	0
Entre 49 y 60 meses	2 (14.3%)
Más de 60 meses	7 (50%)

## 2. Pacientes con Gleason 7 (3+4 / 4+3).

Las edades de los pacientes diagnosticados con Gleason 7 variaron entre los 42 y los 70 años, con un promedio de 58.4 años. El 46.6% se encontró con edades comprendidas entre los 60 y 70 años, seguido por el 40% que se encontró entre los 50 y 60 años, y sólo el 6.7% correspondió a edades por debajo de los 50 años y por arriba de los 70 años (Tabla 4).

El PSA total preoperatorio varió entre 3.81 ng/dl y 14.91 ng/dl, con un promedio de 8.01 ng/dl. El 66.7% cursó con PSA totales que variaron entre 4 a 10 ng/dl, el 26.6% con valores entre 10 y 20 ng/dl, y el 6.7% con valores menores a 4 ng/dl, ninguno de ellos presentó valores mayores a 20 ng/dl. El cociente PSA libre/PSA total en promedio fue de 0.11, se realizó en 73.4% de los paciente y el 66.7% tuvieron valores menores de 0.25, mientras que 6.7% tuvieron valores mayores o iguales a 0.25. No se realizó el PSA libre en 26.6% (Tabla 4)

El estadio tumoral de la neoplasia al momento del diagnóstico correspondió en el 53.3% al pT2c, el 40% se encontró en el estadio pT3a y el otro 6.7% en el estadio pT3b. El 100% de los tumores correspondieron al tipo histológico designado como acinar y al grado histológico 3 (Tabla 4). Ninguno de los pacientes se diagnóstico en los siguientes estadios:

pT1a, pT2a, pT2b y pT4. Se valoró el estado de los ganglios linfáticos en el 6.7% de los casos, donde todos resultaron negativos a metástasis y en el 93.3% del resto de los casos no se valoró el estado ganglionar (Tabla 4).

Los márgenes quirúrgicos se encontraron positivos en el 60% de los casos y negativos en el 40%. Sólo uno de los pacientes (6.7%) tuvo necesidad de tratamiento con quimioterapia y radioterapia, debido al aumento en los niveles de PSA, entre el período comprendido entre el diagnóstico y el momento del estudio, pero el 93.3% restante no fue tratado más que con la prostatectomía radical (Tabla 4).

El tiempo transcurrido entre el momento del diagnóstico y el momento del estudio fue en promedio de 32.47 meses, con intervalos que variaron entre 5 y 76 meses. El 46.7% de los pacientes estudiados se encontraban entre los 25 y 36 meses diagnosticados, el 26.6% tiene menos de 24 meses diagnosticados y el 26.7% tenía más de 49 meses al momento del estudio (Tabla 4).

De todo este grupo de pacientes el 100% estaban vivos al momento del diagnóstico (Tabla 4).

Ninguno de los pacientes presentaron tumores sincrónicos al momento del diagnóstico (Tabla 4) pero si a lo largo del tiempo transcurrido entre el momento del diagnóstico y el momento del estudio, y el diagnóstico histológico fue de Carcinoma Microcítico de pulmón que se presentó en un paciente (6.7%), el resto no presentaron ningún tipo de tumor.

**Tabla 4.** Características de los 15 pacientes con Índice Gleason 7 (3+4/4+3) en prostatectomías radicales realizadas en el Hospital La Paz, Madrid, España.

Adenocarcinoma de Próstata, Gleason 7 (3+4 / 4+3)			
Variable	Nº de Pacientes (%)	Variable	Nº de Pacientes (%)
<b>Edad (Años)</b>		<b>Estado del paciente</b>	
< 50	1 (6.7%)	Vivo	15 (100%)
50-60	6 (40%)	Muerto	0
60-70	7 (46.6%)		
>70	1 (6.7%)		
<b>PSA preoperatorio (ng/ml)</b>		<b>Cociente PSA libre/PSA total</b>	
< 4	1 (6.7%)	< 0,25	10 (66.7%)
4-10	10 (66.7%)	≥ 0.25	1 (6.7%)
10-20	4 (26.6%)	No realizado	4 (26.6%)
>20	0		
<b>Estadio Tumoral</b>		<b>Estado de los ganglios linfáticos</b>	
pT1a		pN1	
pT2a		pN0	1 (6.7%)
pT2b		pNx	14 (93.3%)
pT2c	8 (53.3%)		
pT3a	6 (40%)		
pT3b	1 (6.7%)		
pT4	0		
<b>Grado histológico</b>		<b>Tipo Histológico</b>	
Grado 1		Acinar	15 (100%)
Grado 2		No acinar	0
Grado 3	15 (100%)		
<b>Estado Márgenes</b>		<b>Tratamiento con Rt/QT</b>	
Positivos	9 (60%)	Si	1 (6.7%)
Negativos	6 (40%)	No	14 (93.3%)
<b>Tumores sincrónicos</b>			
Presentes	0		
Ausentes	15 (100%)		

**Tabla 5.** Tiempo transcurrido entre el diagnóstico y el estudio en los 15 pacientes con Índice Gleason 7 (3+4/4+3).

<b>Adenocarcinoma de Próstata, Gleason 7 (3+4 / 4+3)</b>	
<b>Tiempo Transcurrido Entre el Diagnóstico y el Estudio</b>	<b>Nº de Pacientes (%)</b>
Menos de 12 meses	2 (13.3%)
Entre 12 y 24 meses	2 (13.3%)
Entre 25 y 36 meses	7 (46.7%)
Entre 37 y 48 meses	0
Entre 49 y 60 meses	3 (20.0%)
Más de 60 meses	1 (6.7%)

### 3. Pacientes con Gleason 8 (4+4/5+3/3+5) y Gleason 9 (4+5/5+4)

Las edades de los pacientes diagnosticados con Gleason 8-9 variaron entre los 53 y los 73 años, con un promedio de 62.53 años. El 66.7% se encontró con edades comprendidas entre los 60 y 70 años, seguido por el 20% que se encontró entre los 50 y 60 años, y sólo el 13.3% por arriba de los 70 años. Ninguno de los pacientes se diagnóstico con edades menores a los 50 años (Tabla 6).

El PSA total preoperatorio varió entre 3.23 ng/dl y 18.28 ng/dl, con un promedio de 9.28 ng/dl. El 53.3% cursó con PSA totales que variaron entre 4 a 10 ng/dl, el 40% con valores entre 10 y 20 ng/dl, y el 6.7% con valores menores a 4 ng/dl, ninguno de ellos presentó valores mayores a 20 ng/dl. El cociente PSA libre/PSA total en promedio fue de 0.03, pero sólo se realizó en 40% de los pacientes, los cuales tuvieron valores menores de 0.25, mientras que al 60% no se les realizó determinación de PSA libre (Tabla 6).

El estadio tumoral de la neoplasia al momento del diagnóstico correspondió en el 73.3% al pT3a, el 20% se encontró en el estadio pT3b y el otro 6.7% en el estadio pT2c. El 93.4% de los tumores correspondieron al tipo histológico designado como acinar y sólo uno de ellos fue de tipo no acinar (6.6%) de tipo endometriode, pero todos correspondieron al

grado histológico 3 (Tabla 6). Ninguno de los pacientes se diagnóstico en los siguientes estadios: pT1a, pT2a, pT2b y pT4. Se valoró el estado de los ganglios linfáticos en el 20% de los casos, donde todos resultaron negativos a metástasis y en el 80% del resto de los casos no se valoró el estado ganglionar (Tabla 6).

Los márgenes quirúrgicos se encontraron positivos en el 46.7% (7 pacientes) de los casos y negativos en el 53.3% (8 pacientes). De los pacientes con márgenes positivos sólo 3 recibieron tratamiento con quimioterapia y radioterapia, un cuarto sólo recibió quimioterapia y otros dos no recibieron tratamientos adicionales; mientras que de los pacientes con márgenes negativos sólo uno tuvo necesidad de radioterapia. De manera que de todos los pacientes de este grupo el 33.4% recibieron como tratamiento adicional de quimioterapia/radioterapia y el 66.6% no recibieron tratamiento adicional (Tabla 6).

El tiempo transcurrido entre el momento del diagnóstico y el momento del estudio fue en promedio de 39.07 meses, con intervalos que variaron entre 4 y 78 meses. El 33.3% de los pacientes estudiados se encontraban entre los 37 y 48 meses diagnosticados, el 26.7% entre los 25 y 36 meses, el 20% se encontraba por debajo de los 24 meses y un 20% por arriba de los 60 meses; no se encontraron pacientes entre los 49 y los 60 meses (Tabla 7).

De todo este grupo de pacientes el 100% estaban vivos al momento del diagnóstico (Tabla 6), aunque el paciente con la variante histológica de tipo no acinar fue dado de alta a cuidados paliativos.

Ninguno de los pacientes presentaron tumores sincrónicos al momento del diagnóstico pero si a lo largo del tiempo transcurrido entre el momento del diagnóstico y el momento del estudio, y los diagnósticos histológicos fueron de carcinoma neuroendocrino de pulmón, carcinoma de células renales y pólipo adenomatoso, éste último fue diagnosticado en el paciente con la variante histológica de tipo no acinar, el resto no presentaron ningún tipo de tumor (Tabla 7).



**Tabla 6.** Características de los 15 pacientes con Índice Gleason 8 (4+4/5+3/3+5) y Gleason 9 (4+5/5+4) en prostatectomías radicales realizadas en el Hospital La Paz, Madrid, España.

Adenocarcinoma de Próstata, Gleason 8 (4+4/5+3/3+5) y Gleason 9 (4+5/5+4)			
Variable	Nº de Pacientes (%)	Variable	Nº de Pacientes (%)
<b>Edad (Años)</b>		<b>Estado del paciente</b>	
< 50	0	Vivo	15 (100%)
50-60	3 (20%)	Muerto	0
60-70	10 (66.7%)		
>70	2 (13.3%)		
<b>PSA preoperatorio (ng/ml)</b>		<b>Cociente PSA libre/PSA total</b>	
< 4	1 (6.7%)	< 0,25	6 (40%)
4-10	8 (53.3%)	≥ 0.25	0
10-20	6 (40%)	No realizado	9 (60%)
>20	0		
<b>Estadio Tumoral</b>		<b>Estado de los ganglios linfáticos</b>	
pT1a		pN1	
pT2a		pN0	3 (20%)
pT2b		pNx	12 (80%)
pT2c	1 (6.7%)		
pT3a	11 (73.3%)		
pT3b	3 (20%)		
pT4	0		
<b>Grado histológico</b>		<b>Tipo Histológico</b>	
Grado 1		Acinar	14 (93.4%)
Grado 2		No acinar	1 (6.6%)
Grado 3	15 (100%)		
<b>Estado Márgenes</b>		<b>Tratamiento con Rt/QT</b>	
Positivos	7 (46.7%)	Si	5 (33.4%)
Negativos	8 (53.3%)	No	10 (66.6%)
<b>Tumores sincrónicos</b>			
Presentes	0		
Ausentes	15 (100%)		

**Tabla 7.** Tiempo transcurrido entre el diagnóstico y el estudio en los 15 pacientes con Índice Gleason 8 (4+4/5+3/3+5) y Gleason 9 (4+5/5+4).

<b>Adenocarcinoma de Próstata, Gleason 8 y9</b>	
<b>Tiempo Transcurrido Entre el Diagnóstico y el Estudio</b>	<b>Nº de Pacientes (%)</b>
Menos de 12 meses	1 (6.7%)
Entre 12 y 24 meses	2 (13.3%)
Entre 25 y 36 meses	4 (26.7%)
Entre 37 y 48 meses	5 (33.3)
Entre 49 y 60 meses	0
Más de 60 meses	3 (20%)

## II DETERMINACIÓN DE LAS PROTEÍNAS BASALES: BCL-2, CK19 Y KI-67

### 1. Expresión inmunohistoquímica de Bcl-2

En los tumores Gleason 6, en las áreas de neoplasia intraepitelial de alto grado (PIN) la expresión basal de Bcl-2 se presentó en forma homogénea fuerte (42.9%) y heterogénea fuerte (42.9%) predominantemente, sin dejarse de expresar en ninguna de las células basales; mientras que a nivel luminal se expresó en forma heterogénea fuerte (64.3%) y débil (21.4%) predominantemente, estando negativa en 14.3% de los casos. En el caso de las células neoplásicas éstas sólo fueron positivas en el 14.2% de los casos, con expresión homogénea (7.1%) y heterogénea (7.1%) fuerte, pero no se expresó en el 85.8% de los casos (Tabla 8).

En los tumores Gleason 7, en las áreas de PIN la expresión basal de Bcl-2 fue predominantemente fuerte homogénea en el 73.3% de los casos, expresándose de forma heterogénea fuerte (13.3%) y débil (13.3%) en el resto, sin dejarse de expresar en ninguna de las células basales; mientras que a nivel luminal su expresión predominante fue de tipo heterogénea fuerte en el 86.6% de los casos. En el caso de las células neoplásicas el 100% no expresó positividad para Bcl-2 (Tabla 8) (Figura Nº1, A y D).

En los tumores Gleason 8-9, en las áreas de PIN la expresión basal de Bcl-2 fue predominantemente fuerte heterogénea (47.3%), también se expresó de forma fuerte homogénea (13.3%), débil heterogénea (20%) y fue negativa en 20% de los casos. A nivel luminal la expresión fue heterogénea fuerte (66.7%) y débil (33.3%), no se vieron casos con expresión totalmente negativa o fuerte homogénea. En las células neoplásicas la expresión negativa fue en un 60% (Figura N°1C), pero en el 40% restante se expresó en forma fuerte homogénea (6.7%) y heterogénea fuerte (20%) y débil (13.3%) (Tabla 8).

## 2. Expresión inmunohistoquímica de CK19

En los tumores Gleason 6, en las áreas de PIN la expresión de CK19 basal fue predominantemente fuerte homogénea (64.3%) y débil heterogénea (28.6%), sin ser totalmente negativa en las áreas de PIN. A nivel luminal la expresión fue de distribución heterogénea fuerte (43%) y débil (36%), con una menor proporción fuerte homogénea (21%). En las células neoplásicas la expresión fue predominantemente en forma fuerte heterogénea (50%), seguida del patrón débil heterogéneo (28.6%) y fuerte homogéneo (21.4%), sin ser totalmente negativa en ninguno de los casos estudiados (Tabla 8).

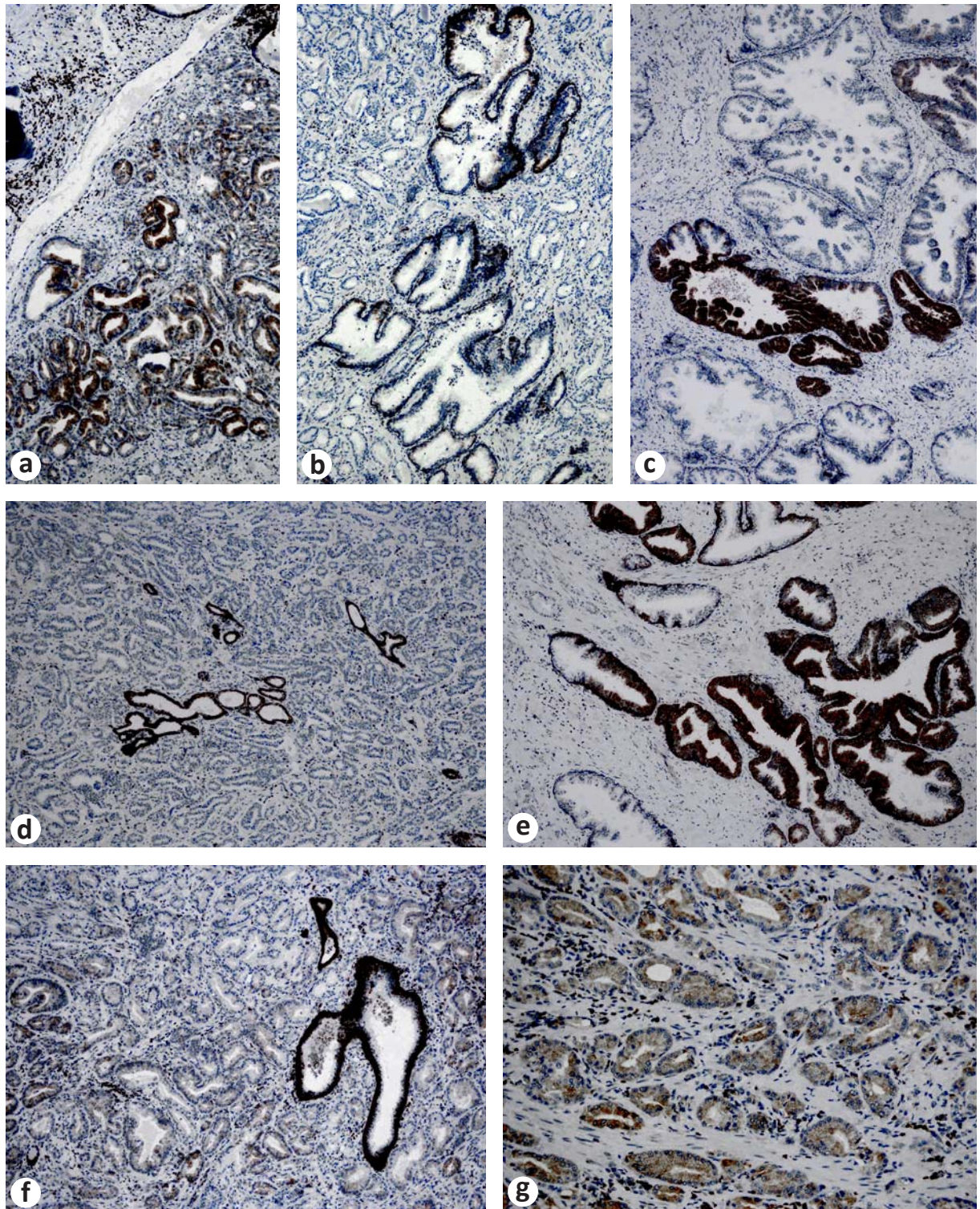
En los tumores Gleason 7, en las áreas de PIN la expresión inmunohistoquímica de CK19 a nivel basal fue de distribución fuerte homogénea (93.3%), encontrándose únicamente un caso (6.7%) de distribución débil heterogénea. A nivel luminal la expresión fue predominantemente fuerte heterogénea (93.3%), con un caso de expresión fuerte homogénea (6.7%). En las células neoplásicas la expresión fue fuerte homogénea (46.7%) y heterogénea (33.3%), siendo totalmente negativo en 20% de los casos estudiados (Tabla 8).

En los tumores Gleason 8 y 9, en las áreas de PIN la expresión inmunohistoquímica de CK19 basal fue fuerte homogénea (80%) y heterogénea (20%), sin encontrarse casos de patrón débil heterogéneo o negativo. A nivel luminal la distribución fue predominantemente de patrón fuerte homogéneo (13.3%) y heterogéneo (66.7%), con un 20% de patrón heterogéneo débil. Las células neoplásicas fueron positivas en un 80% de los casos con los diferentes patrones fuerte homogéneo (46.7%), fuerte heterogéneo (33.3%) y débil heterogéneo (20%); siendo negativas en el 20% de los casos (Tabla 8).

**Tabla 8.** Expresión inmunohistoquímica de las proteínas basales en adenocarcinomas de próstata Gleason 6, 7, 8 y 9 y áreas de PIN en prostatectomías radicales realizadas en el Hospital La Paz, Madrid, España.

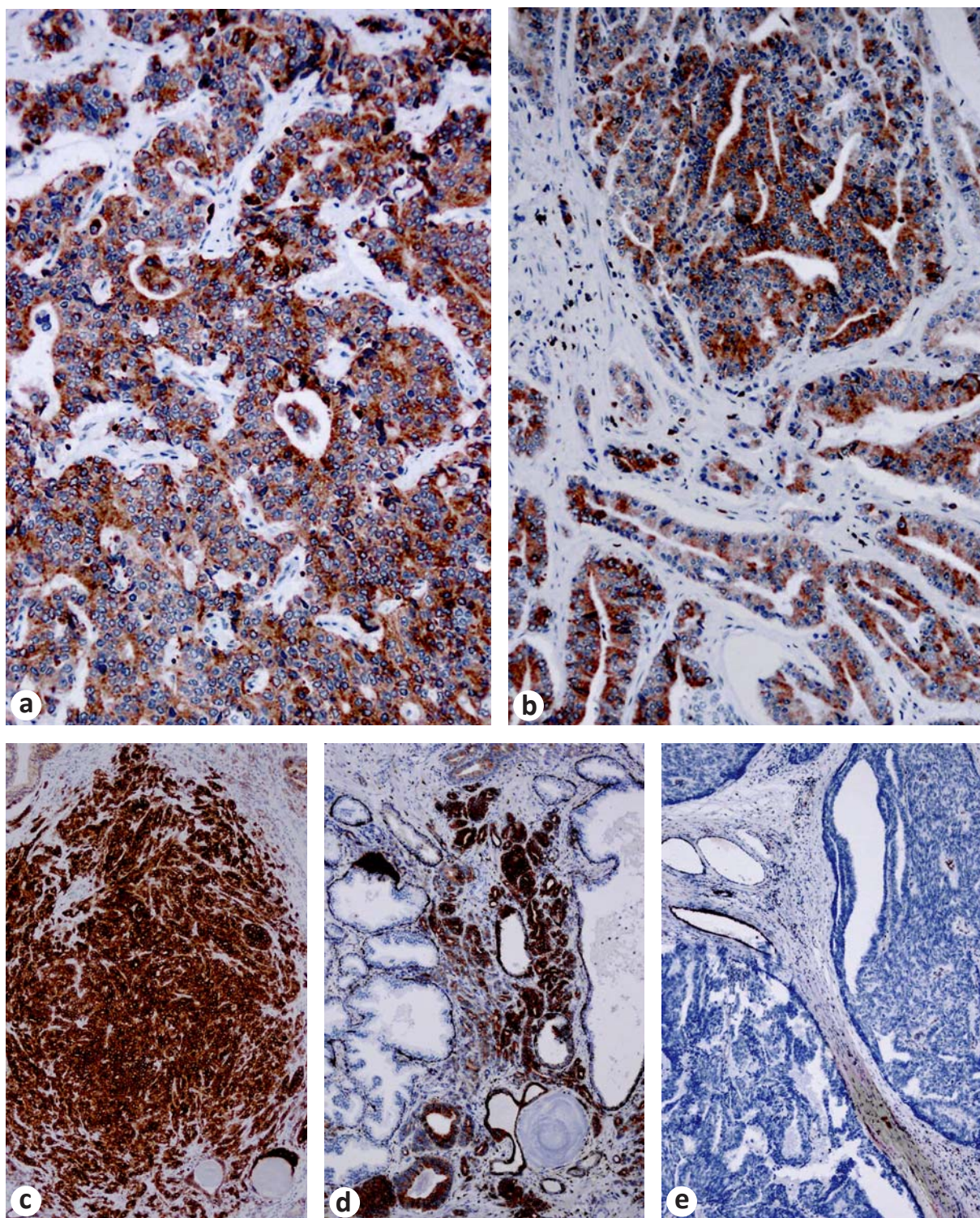
Gleason	Lesión	Tipo de Célula	Distribución	Bcl-2 N° Pacientes (%)	CK19 N° Pacientes (%)
Gleason 6	PIN	Basal	Fuerte-Homo Fuerte-Hete Débil-Hete Negativo	6 (42.9%) 6 (42.9%) 2 (14.2%) 0	9 (64.3%) 1 (7.1%) 4 (28.6%) 0
		Luminal	Fuerte-Homo Fuerte-Hete Débil-Hete Negativo	0 9 (64.3%) 3 (21.4%) 2 (14.3%)	3 (21.4%) 6 (42.9%) 5 (35.7%) 0
	CÁNCER	Neoplásica	Fuerte-Homo Fuerte-Hete Débil-Hete Negativo	1 (7.1%) 1 (7.1%) 0 12 (85.8%)	3 (21.4%) 7 (50%) 4 (28.6%) 0
Gleason 7	PIN	Basal	Fuerte-Homo Fuerte-Hete Débil-Hete Negativo	11 (73.3%) 2 (13.3%) 2 (13.3%) 0	14 (93.3%) 0 1 (6.7%) 0
		Luminal	Fuerte-Homo Fuerte-Hete Débil-Hete Negativo	0 13 (86.6%) 1 (6.7%) 1 (6.7%)	1 (6.7%) 14 (93.3%) 0 0
	CÁNCER	Neoplásica	Fuerte-Homo Fuerte-Hete Débil-Hete Negativo	0 0 0 15 (100%)	7 (46.7%) 5 (33.3%) 0 3 (20%)
Gleason 8 – 9	PIN	Basal	Fuerte-Homo Fuerte-Hete Débil-Hete Negativo	2 (13.3%) 7 (47.3%) 3 (20%) 3 (20%)	12 (80%) 3 (20%) 0 0
		Luminal	Fuerte-Homo Fuerte-Hete Débil-Hete Negativo	0 10 (66.7%) 5 (33.3%) 0	2 (13.3%) 10 (66.7%) 3 (20%) 0
	CÁNCER	Neoplásica	Fuerte-Homo Fuerte-Hete Débil-Hete Negativo	1 (6.7%) 3 (20%) 2 (13.3%) 9 (60%)	3 (20%) 7 (46.7%) 2 (13.3%) 3 (20%)





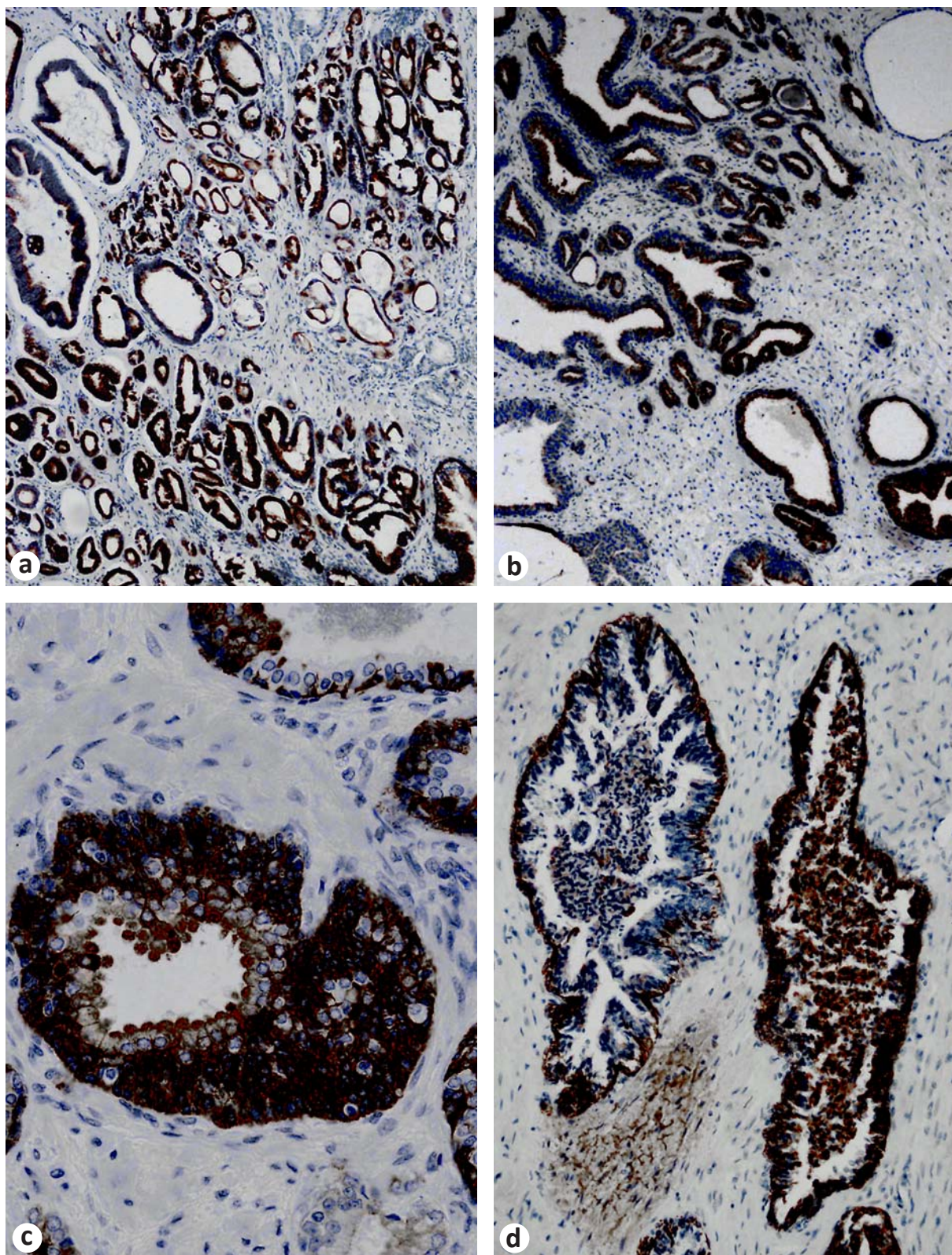
**Fig 3.** Expresión inmunohistoquímica de Bcl-2 en PIN y en carcinoma de próstata infiltrante. En los tumores bien a moderadamente diferenciados, la expresión de BCL-2 se presenta en las glándulas atróficas y en la áreas de PIN, pero es casi nula en las células neoplásicas. **a-c:** Grado de Gleason 3+3. **d-g:** Grado de Gleason 4+3.





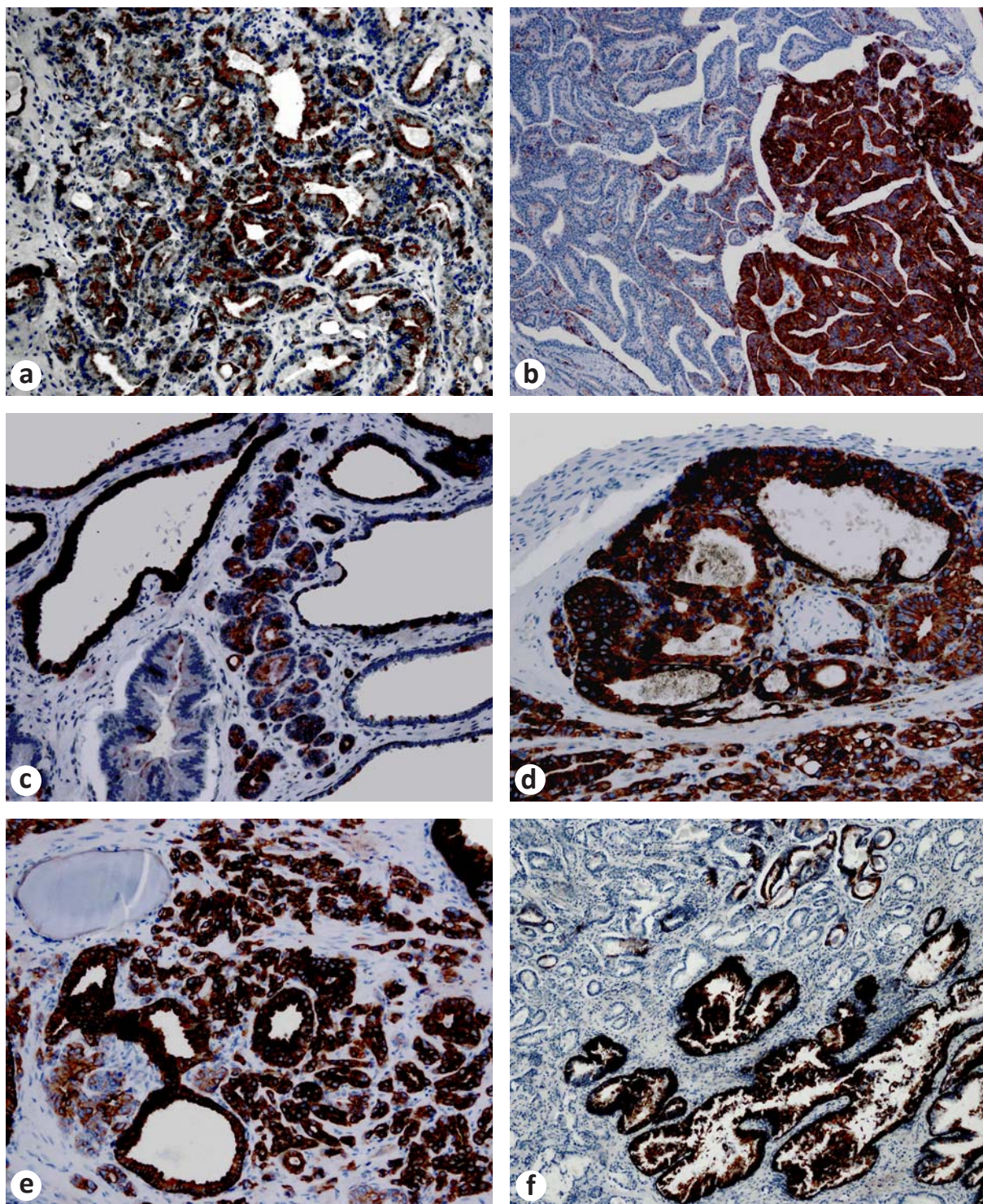
**Fig 4.** Expresión inmunohistoquímica de Bcl-2 en PIN y en carcinoma de próstata infiltrante. En los tumores pobremente diferenciados, el BCL-2 comienza a expresarse en las células neoplásicas en forma heterogénea (**a, b**) y homogénea (**d, c**); pero en único caso de tipo no acinar solo se expresó a nivel de las células basales (**e**). **a-d**: Grado de Gleason 4+5. **e**: Grado de Gleason 5+4.





**Fig 5.** Expresión inmunohistoquímica de citokeratina CK-19 en PIN y en carcinoma de próstata infiltrante. La citoqueratina 19 se expresa en las áreas de PIN (células basales) y en las áreas del carcinoma. **a-d:** Grado de Gleason 3+3.





**Fig 6.** Expresión inmunohistoquímica de citokeratina CK-19 en PIN y en carcinoma de próstata infiltrante. La citoqueratina 19 se expresa en todos los tipos de tumores moderadamente diferenciados (**a-c**) y pobremente diferenciados (**d-f**), aunque en estos últimos es de forma heterogénea. **a:** Grado de Gleason 3+4. **b-e:** Grado de Gleason 4+5. **f:** Grado de Gleason 5+5.



### 3. Expresión Inmunohistoquímica de Ki-67

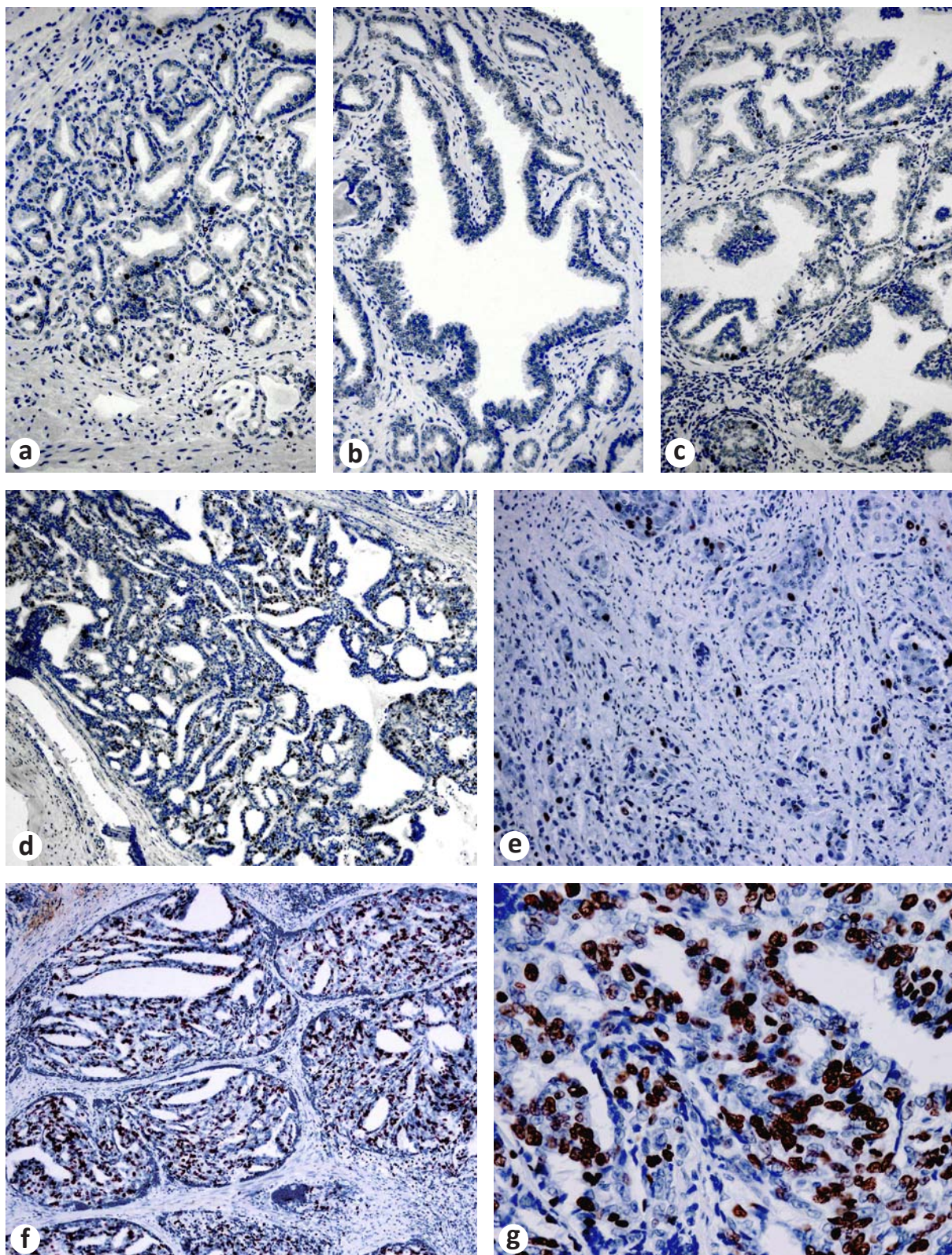
Los resultados fueron los siguientes: Tumores Gleason 6: con un índice de proliferación en el PIN de 3.59%; y en el 93% de estos casos el índice de proliferación fue menor del 5% y sólo el 7% expresó entre el 6 y 20%. En las áreas de las células neoplásicas el índice de proliferación promedio fue de 15.3%, con índices menores al 5% en un 43%, entre el 6 y 20% aumento al 50% y el 7% se encontró con valores mayores del 20% (Tabla 9).

Tumores Gleason 7: el promedio de índice de proliferación en las áreas de PIN fue de 5.16%, siendo menor al 5% un 67%, entre el 6 y 20% el 33% y no encontrándose ningún caso con índices mayores al 20%. En el caso de las células neoplásicas el índice de proliferación promedio fue del 15.3%, con índices menores al 5% en el 7% de los casos, índices entre el 6 y 20% en el 60% de los casos, y valores mayores al 20% en un 33% de los casos (Tabla 9).

Tumores Gleason 8-9: el índice de proliferación en las áreas de PIN fue de 5.79%, con índices menores al 5% en el 67% de los casos, índices entre 6 y 20% en un 33%, sin encontrar casos con índices mayores al 20%. El índice de proliferación de las células neoplásicas fue de 21.64%, con índices menores a 5% en el 13% de los casos, índices entre el 6 y 20% en el 47% de los casos, y valores mayores al 20% en el 40% de los casos.

**Tabla 9.** Expresión inmunohistoquímica del índice de proliferación (Ki-67) en adenocarcinomas de próstata Gleason 6, 7, 8 y 9 y áreas de PIN en prostatectomías radicales realizadas en el Hospital La Paz, Madrid, España.

Gleason	Lesión	Expresión de Ki-67: N° Pacientes (%)		
		Menor o igual al 5%	Entre el 6 y 20%	Mayor del 20%
Gleason 6	PIN	13 (93%)	1 (7%)	0
	Cáncer	6 (43%)	7 (50%)	1 (7%)
Gleason 7	PIN	10 (67%)	5 (33%)	0
	Cáncer	1 (7%)	9 (60%)	5 (33%)
Gleason 8-9	PIN	10 (67%)	5 (33%)	0
	Cáncer	2 (13%)	7 (47%)	6 (40%)



**Fig 7.** Expresión inmunohistoquímica de Ki 67 en PIN y en carcinoma de próstata infiltrante. El índice de proliferación es bajo en el adenocarcinoma de próstata bien diferenciado, y alto en algunos carcinomas pobremente diferenciados. **a-c:** Grado de Gleason 3+3. **d:** Grado de Gleason 4+4. **e:** Grado de Gleason 4+5. **f, g:** Grado de Gleason 5+4.



#### 4. Determinación de la Expresión del Receptor de Andrógenos

En cuanto a la expresión inmunohistoquímica del receptor de andrógenos (RA) los resultados fueron los siguientes:

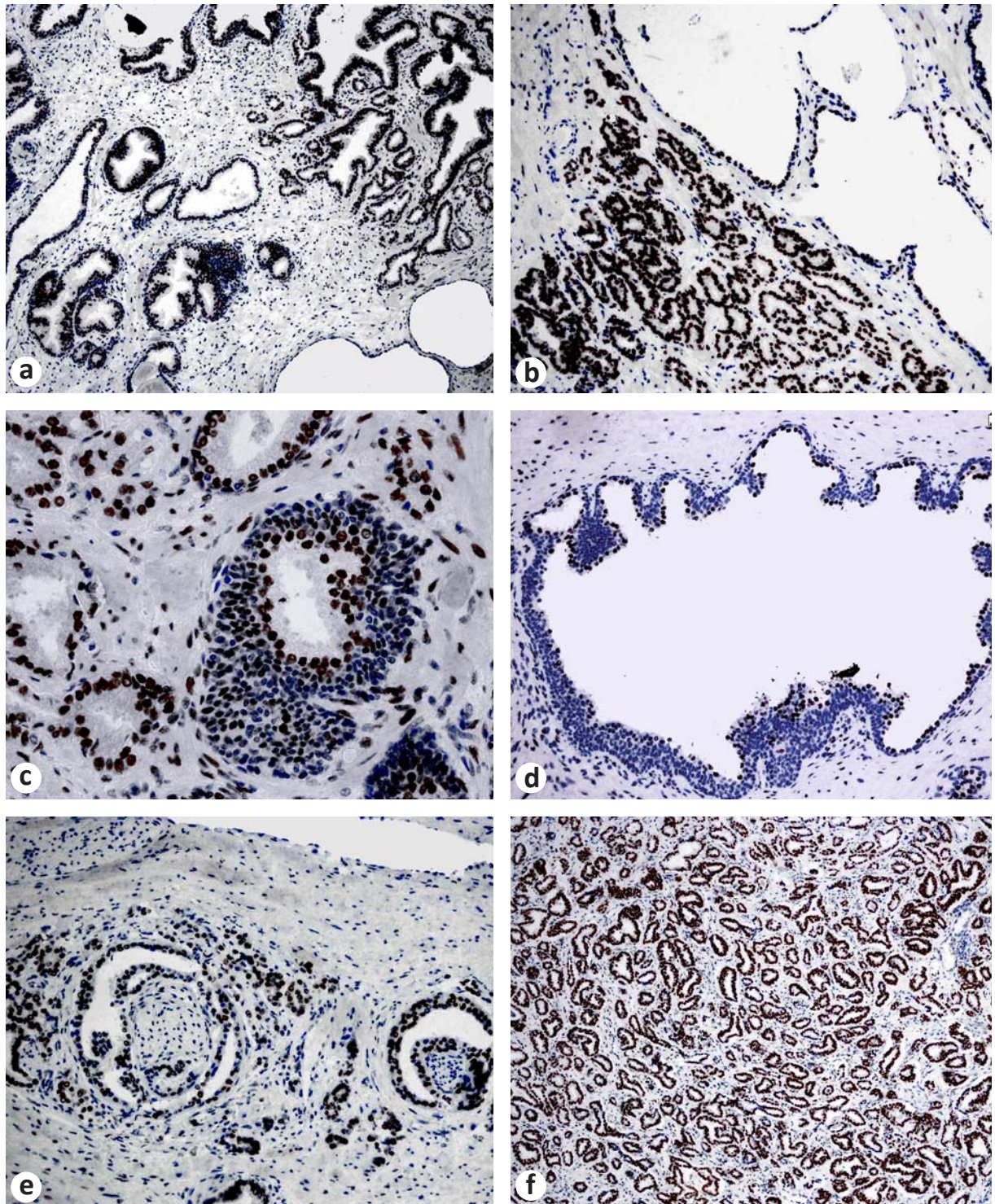
Tumores Gleason 6: en las áreas de PIN, a nivel basal el 100 % de los tumores no expresó el RA; mientras que a nivel luminal la expresión fue variable variando desde fuerte homogéneo (21.4%) y heterogéneo (57.2%), hasta homogéneo débil (21.4%), pero sin ser totalmente negativo. En las células neoplásicas la expresión también fue variable predominando el patrón fuerte homogéneo (71.4%), seguido por el patrón débil homogéneo (21.5%) y heterogéneo fuerte (7.1%) (Tabla 10).

Tumores Gleason 7: en las áreas de PIN, a nivel basal el 86.7% de los tumores no expresaron el RA, y sólo un 13.3% lo expresó en patrón fuerte homogéneo; mientras que a nivel luminal la expresión siguió siendo variable, con un patrón fuerte heterogéneo predominante, en comparación con los otros patrones menos frecuentes: fuerte homogéneo (20%) y débil homogéneo (13.3%), y siendo sólo el 6.7% totalmente negativo (Tabla 10).

Tumores Gleason 8 – 9 : en las áreas de PIN, a nivel basal el 100% de los tumores expresaron el RA, en cuanto a nivel luminal la expresión fue variable predominando el patrón fuerte heterogéneo (80%), seguido por los patrones menos frecuentes de débil homogéneo (13.3%) y fuerte homogéneo (6.7%), sin encontrarse un caso totalmente negativo. En las células neoplásicas el 80% de los tumores expresaron el patrón fuerte homogéneo, y en menos frecuencia los patrón fuerte heterogéneo (13.3%) y débil homogéneo (6.7%), sin encontrarse ningún caso totalmente negativo (Tabla 10).

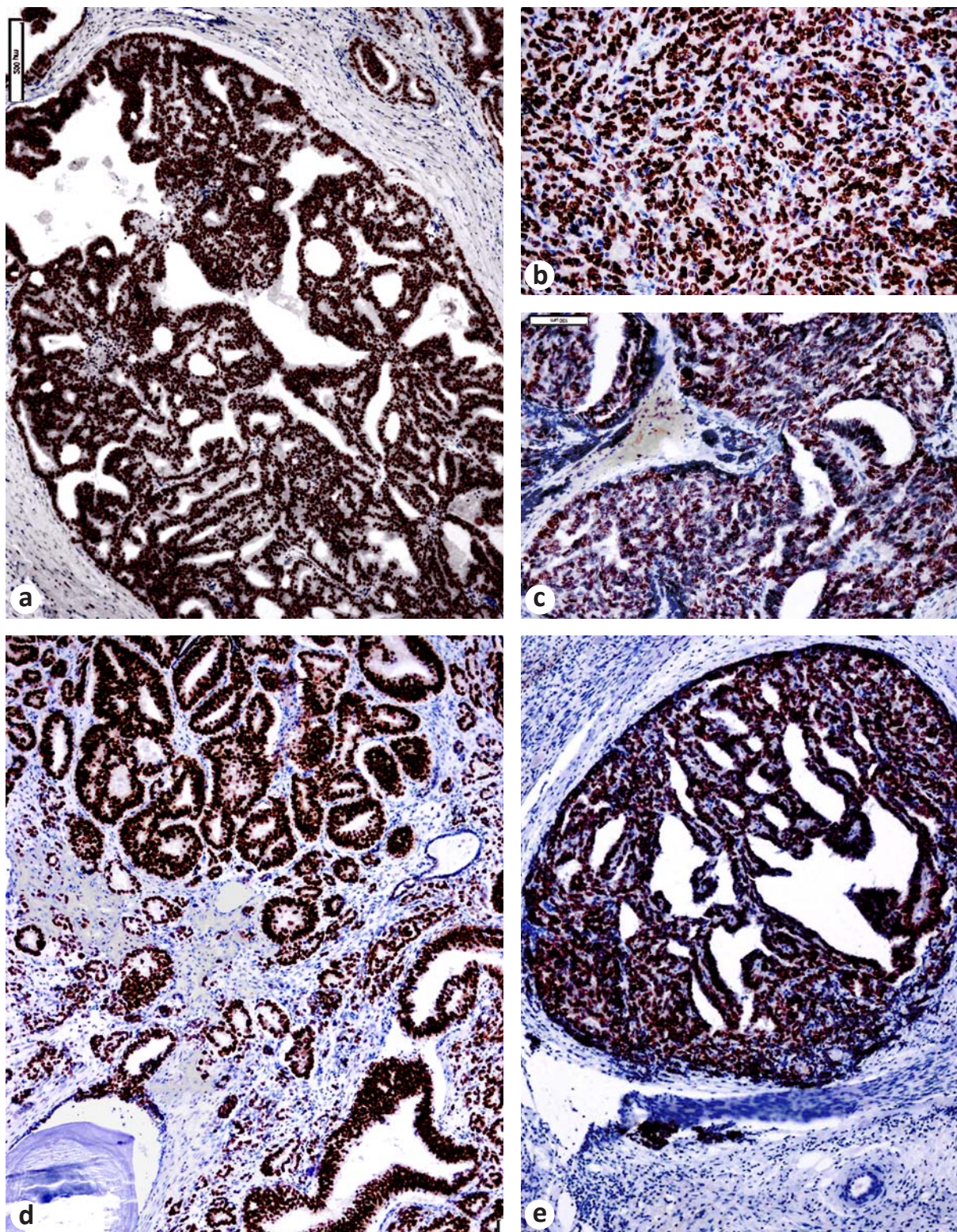
**Tabla 10.** Expresión inmunohistoquímica del receptor de andrógenos en adenocarcinomas de próstata Gleason 6, 7, 8 y 9 y áreas de PIN en prostatectomías radicales realizadas en el Hospital La Paz, Madrid, España.

Gleason	Lesión	Tipo de Célula	Distribución	Receptor de Andrógenos Nº de Pacientes (%)
Gleason 6	PIN	Basal	Fuerte-Homo Fuerte-Hete Débil-Homo Negativo	0 0 0 14 (100%)
		Luminal	Fuerte-Homo Fuerte-Hete Débil-Homo Negativo	3 (21.4%) 8 (57.2%) 3 (21.4%) 0
	CÁNCER	Neoplásica	Fuerte-Homo Fuerte-Hete Débil-Homo Negativo	10 (71.4%) 1 (7.1%) 3 (21.5%) 0
Gleason 7	PIN	Basal	Fuerte-Homo Fuerte-Hete Débil-Homo Negativo	2 (13.3%) 0 0 13 (86.7%)
		Luminal	Fuerte-Homo Fuerte-Hete Débil-Homo Negativo	3 (20%) 9 (60%) 2 (13.3%) 1 (6.7%)
	CÁNCER	Neoplásica	Fuerte-Homo Fuerte-Hete Débil-Homo Negativo	13 (86.6%) 1 (6.7%) 1 (6.7%) 0
Gleason 8 – 9	PIN	Basal	Fuerte-Homo Fuerte-Hete Débil-Homo Negativo	0 0 0 15 (100%)
		Luminal	Fuerte-Homo Fuerte-Hete Débil-Homo Negativo	1 (6.7%) 12 (80%) 2 (13.3%) 0
	CÁNCER	Neoplásica	Fuerte-Homo Fuerte-Hete Débil-Homo Negativo	12 (80%) 2 (13.3%) 1 (6.7%) 0



**Fig 8.** Expresión inmunohistoquímica del Receptor de Andrógenos en PIN y en carcinoma de próstata infiltrante. El receptor de andrógenos se expresa en las células luminales normales y en las células neoplásicas de forma homogénea. **a-c:** Grado de Gleason 3+3. **d:** Grado de Gleason 3+5. **e, f:** Grado de Gleason 4+3.





**Fig 9.** Expresión inmunohistoquímica del Receptor de Andr6genos en PIN y en carcinoma de pr6stata infiltrante. **a:** Grado de Gleason 4+4. **b-d:** Grado de Gleason 4+5. **e:** Grado de Gleason 5+4.



## 5. Determinación de la Expresión de la proteína p27

En relación con la expresión inmunohistoquímica de la proteína p27 los resultados fueron los siguientes:

Tumores Gleason 6: a nivel basal la expresión fue predominantemente negativa (64.4%), seguida del patrón débil heterogéneo (21.4%) y encontrándose únicamente el 7.1% para la expresión fuerte homogénea y heterogénea respectivamente. A nivel luminal, la expresión fue predominantemente fuerte heterogénea (57.2%), seguida del patrón fuerte homogéneo (35.7%), sin encontrarse ningún caso totalmente negativo. En el caso de las células neoplásicas prácticamente el patrón predominante fue el fuerte en sus dos presentaciones homogéneo (50%) y heterogéneo (42.9%), sin encontrarse ningún caso totalmente negativo (Tabla 11).

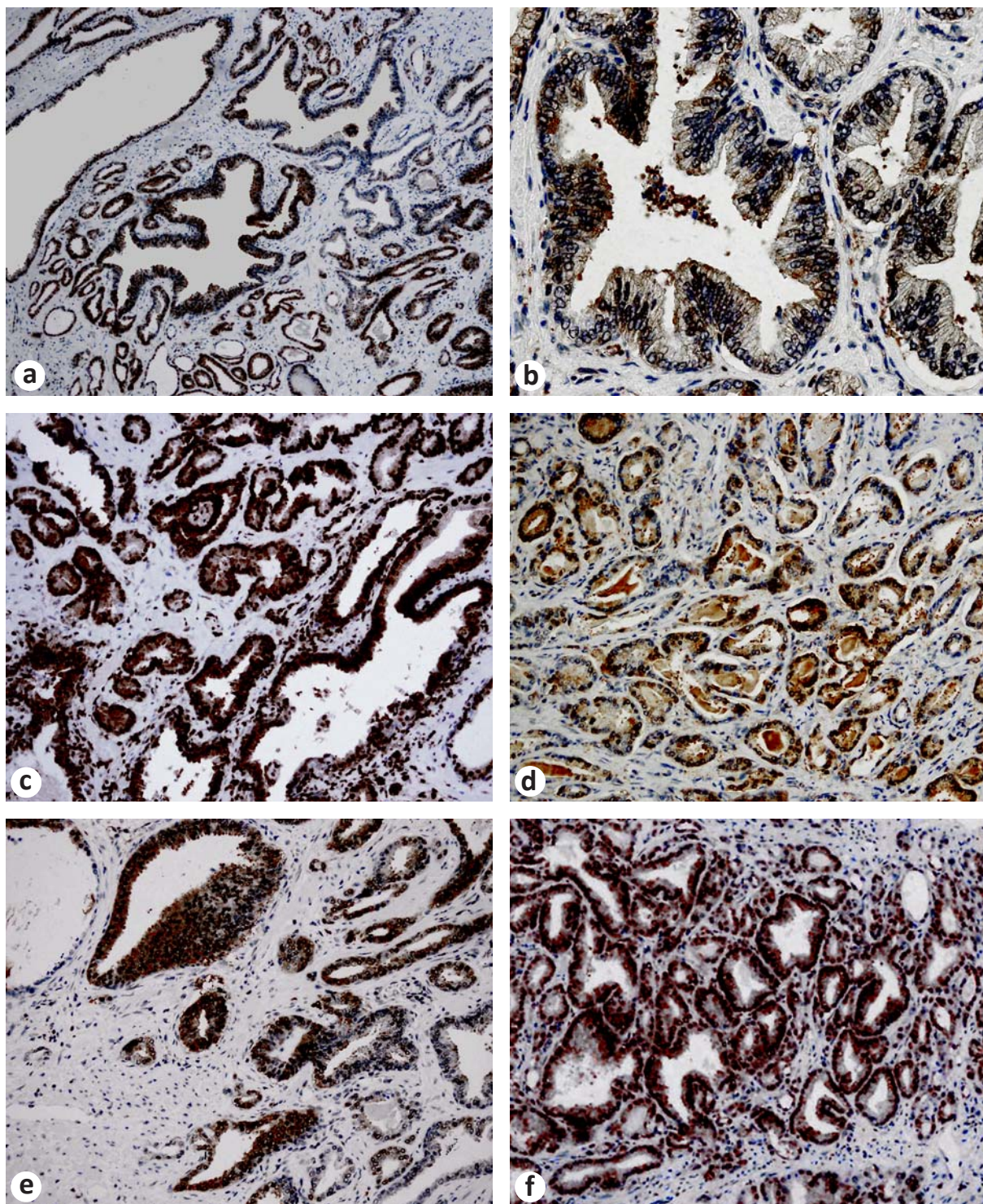
Tumores Gleason 7: a nivel basal la expresión fue más bien heterogénea débil (33.3%) y fuerte (26.7%), siendo negativa en el 40% de los casos. A nivel luminal la expresión predominante fue fuerte heterogénea (73.4%), seguido de los patrones fuerte homogéneo (13.3%) y débil heterogéneo (13.3%), sin encontrar casos totalmente negativos. En las células neoplásicas la expresión predominante fue la fuerte en sus dos patrones homogénea (53.3%) y heterogéneo (40%), si encontrar casos totalmente negativos (Tabla 10).

Tumores Gleason 8- 9: a nivel basal la expresión fue predominantemente de patrón débil heterogéneo (66.7%), con el 13.3% de patrón fuerte homogéneo y negativo en el 20% de los casos. A nivel luminal, la expresión predominante fue heterogénea en sus dos patrones fuerte (80%) y débil (13.3%), sin llegar a ser totalmente negativa en algún caso. En las células neoplásicas el patrón predominante fue también el heterogéneo en su dos patrones fuerte (60%) y débil (13.3%), seguido del patrón fuerte homogéneo (26.7%), sin encontrarse casos totalmente negativos (Tabla 10).

**Tabla 11.** Expresión inmunohistoquímica de la proteína p27 en adenocarcinomas de próstata Gleason 6, 7, 8 y 9 y áreas de PIN en prostatectomías radicales realizadas en el Hospital La Paz, Madrid, España.

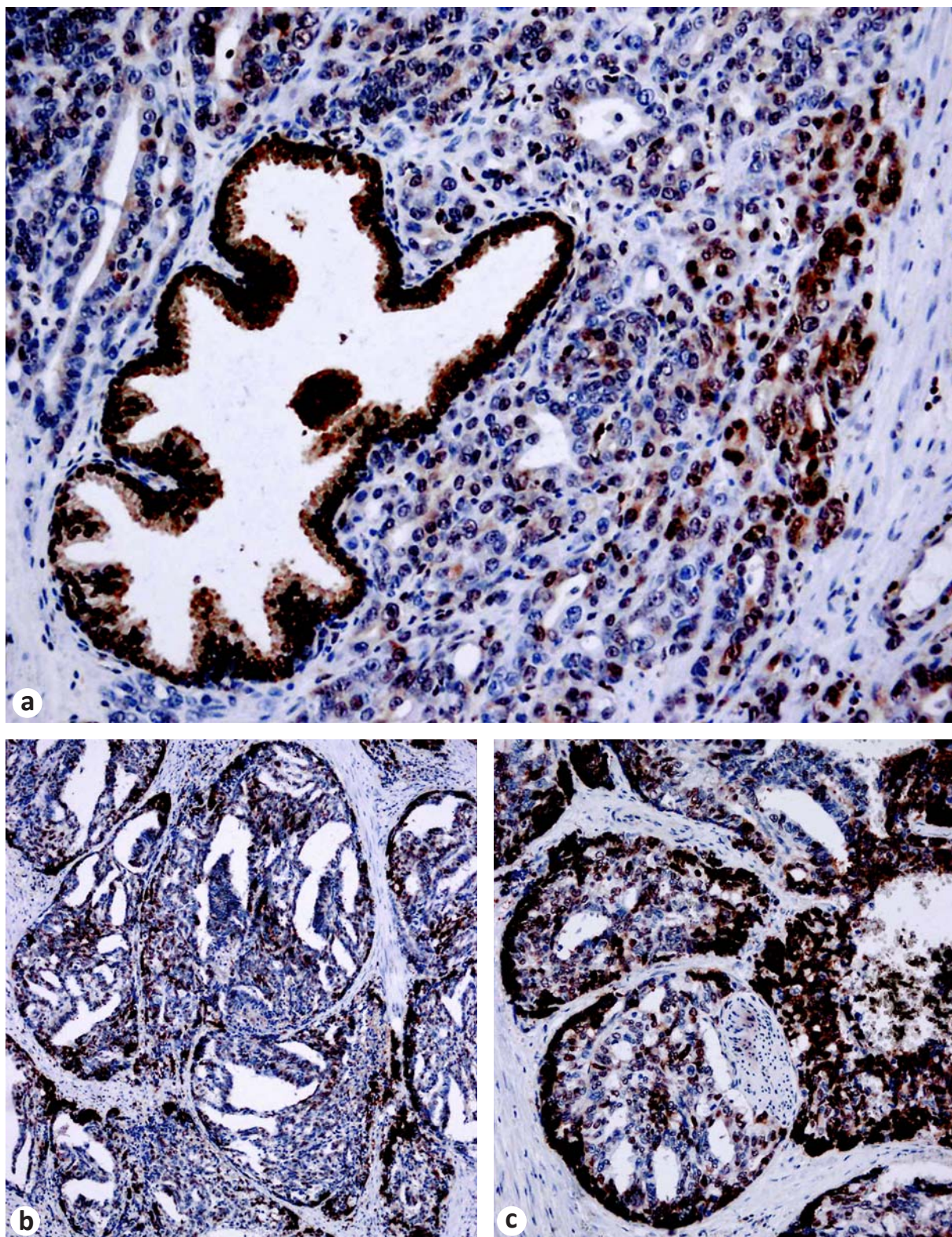
Gleason	Lesión	Tipo de Célula	Distribución	Proteína p27 Nº de Pacientes (%)
Gleason 6	PIN	Basal	Fuerte-Homo Fuerte-Hete Débil-Hete Negativo	1 (7.1%) 1 (7.1%) 3 (21.4%) 9 (64.4%)
		Luminal	Fuerte-Homo Fuerte-Hete Débil-Homo Negativo	5 (35.7%) 8 (57.2%) 1 (7.1%) 0
	CÁNCER	Neoplásica	Fuerte-Homo Fuerte-Hete Débil-Homo Negativo	7 (50%) 6 (42.9%) 1 (7.1%) 0
Gleason 7	PIN	Basal	Fuerte-Homo Fuerte-Hete Débil-Hete Negativo	0 4 (26.7%) 5 (33.3%) 6 (40%)
		Luminal	Fuerte-Homo Fuerte-Hete Débil-Hete Negativo	2 (13.3%) 11 (73.4%) 2 (13.3%) 0
	CÁNCER	Neoplásica	Fuerte-Homo Fuerte-Hete Débil-Hete Negativo	8 (53.3%) 6 (40%) 1 (6.7%) 0
Gleason 8 – 9	PIN	Basal	Fuerte-Homo Fuerte-Hete Débil-Hete Negativo	2 (13.3%) 0 10 (66.7%) 3 (20%)
		Luminal	Fuerte-Homo Fuerte-Hete Débil-Hete Negativo	1 (6.7%) 12 (80%) 2 (13.3%) 0
	CÁNCER	Neoplásica	Fuerte-Homo Fuerte-Hete Débil-Hete Negativo	4 (26.7%) 9 (60%) 2 (13.3%) 0





**Fig 10.** Expresión inmunohistoquímica de p27 en PIN y en carcinoma de próstata infiltrante. **a-f:** Grado de Gleason 3+3.





**Fig 11.** Expresión inmunohistoquímica de p27 en PIN y en carcinoma de próstata infiltrante. En el PIN, el p27 se expresa en forma homogénea, pero deja de expresarse en los carcinomas de alto grado. **a:** Grado de Gleason 4+5. **b, c:** Grado de Gleason 5+4.

## DISCUSIÓN

El pronóstico para los pacientes con cáncer de próstata puede ser definido como la predicción del comportamiento futuro de la malignidad previamente establecida, así como la ausencia de la misma después de la aplicación de su terapia. Los factores predictivos han sido divididos en dos categorías<sup>53</sup>.

1. Factores pronósticos: aquellos que predicen el relapso o progresión de la neoplasia, independiente de los efectos del futuro tratamiento.

2. Factores predictivos: aquellos que predicen la respuesta o resistencia a una terapia específica del cáncer.

Actualmente, no hay factores predictivos o marcadores que se utilicen efectivamente en el cáncer de próstata. Por ejemplo, a diferencia del cáncer de mama, donde la expresión del receptor de estrógeno, predice la respuesta al tratamiento con tamoxifeno; la expresión del receptor de andrógeno no predice la respuesta a la terapia hormonal<sup>53</sup>.

Así, los factores pronósticos aceptados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el cáncer de próstata se han dividido en los siguientes grupos<sup>53</sup>:

Categoría I: los factores establecidos recomendados para ser reportados rutinariamente: estadio TNM, grado histológico (Gleason), estatus de los márgenes quirúrgicos y los niveles de PSA pre quirúrgico.

Categoría II: los factores prometedores o recomendados a pesar de sus datos incompletos: DNA ploidia, tipo histológico, cantidad tumoral en el tejido producto de biopsia por trucut (recomendado), cantidad de tumor en los especímenes de prostatectomía radical (recomendado).

Categoría III: los factores pronósticos no recomendados debido a evidencia insuficiente: marcadores genéticos, marcadores neuroendocrinos, marcadores de proliferación y apoptosis, invasión peri neural, invasión vascular o linfática, densidad micro vascular, morfometría nuclear y expresión del receptor de andrógenos.

## CATEGORÍA I: FACTORES PRONÓSTICOS DE RUTINA

### ***Patrón Gleason, Estadío TNM y Niveles de PSA Pre-operatorios***

El PSA es sintetizado por el epitelio ductal y los acinos prostáticos. Se encuentra tanto en el tejido prostático normal, el hiperplásico y el neoplásico (cáncer de próstata). El PSA es secretado dentro de la luz de los ductos prostáticos hasta llegar a ser componente del plasma seminal. Alcanza este plasma por difusión desde las células luminales a través de la membrana basal epitelial y del estroma, donde puede pasar a través de la membrana basal capilar<sup>37</sup>.

Numerosos estudios han mostrado que pacientes con cáncer de próstata tienen, en general, elevados los niveles séricos de PSA si se compara con los niveles de PSA en hombres sin cáncer de próstata. El nivel más comúnmente usado para hacer el corte entre lo normal y anormal es 4 ng/ml. Cuando los niveles de PSA se encuentran entre 4 y 10 ng/ml, la incidencia en la detección de cáncer de próstata en biopsia de próstata, en un hombre con examen rectal digital normal es del 25%. Con niveles de PSA por arriba de 10ng/ml, la incidencia de cáncer de próstata en una biopsia se incrementa en un 67%. Sin embargo, el riesgo de cáncer es proporcional a los niveles de PSA séricos aún cuando el valor es menor a los 4 ng/dl. Con un nivel de PSA menor de 2 ng/ml la probabilidad de cáncer de próstata es menor al 2%; la probabilidad se eleva a aproximadamente el 18% con niveles de PSA entre los 2.5 a 4 ng/ml. Un gran número de estudios clínicos han demostrado cánceres clínicamente significantes en hombres con niveles séricos de PSA entre 2.5 y 4 ng/ml, por lo que algunos expertos han propuesto niveles séricos de PSA de 2.5 ng/dl como corte para definir entre lo normal y lo patológico, y así mejorar la detección temprana de cáncer de próstata en hombres jóvenes<sup>37</sup>.

La razón por la cual los niveles séricos de PSA por sí mismos, no son diagnósticos en el cáncer de próstata es el hecho que el tejido normal de la próstata también produce PSA sérico. Así otras patologías como la prostatitis, el infarto, la instrumentación de la próstata y la eyaculación también aumentan los niveles séricos de PSA. El examen rectal digital no parece elevar los niveles de PSA, aunque un masaje rectal vigoroso y la biopsia por trucut si



lo elevan. Seguido de los dos últimos eventos enunciados se recomienda esperar de 4 a 6 semanas antes de medir nuevamente los niveles de PSA<sup>37</sup>.

Por otro lado hombres con hiperplasia prostática benigna tendrán niveles más altos de PSA que los hombres con una próstata pequeña. La medición de la densidad de los niveles de PSA con respecto al volumen de la próstata, ayuda a excluir a las próstatas con hiperplasia. La densidad sérica del PSA se calcula dividiendo los niveles séricos de PSA sérico entre el volumen estimado de la glándula, lo cual da un valor alto aproximado de 0.15<sup>37</sup>.

En los hombres de edad, sus próstatas tienden a ser grandes con hiperplasia prostática benigna, por tanto debe anticiparse que estos hombres manejen niveles séricos de PSA mayores que los normales para un hombre más joven. Ante esto se ha recomendado los siguientes niveles de referencia específicos para cada edad<sup>37</sup>:

Niveles de PSA de hasta 2.5 ng/ml, para hombres entre los 40 a 49 años

Niveles de PSA de hasta 3.5 ng/ml, para hombres entre los 50 a 59 años

Niveles de PSA de hasta 4.5 ng/ml, para hombres entre los 60 a 69 años

Niveles de PSA de hasta 6.5 ng/ml, para hombres entre los 70 a 79 años.

Esta última clasificación de los niveles de PSA séricos y del PSA tendría como resultado realizar un mayor número de biopsias en jóvenes con relativos niveles bajos de PSA, y disminuir el número de biopsias en hombres mayores con niveles mayores a 4 ng/ml<sup>37</sup>.

Alrededor de los años 90, se descubrió que han diferentes formas moleculares del PSA sérico. Una vez que el PSA es liberado a la circulación, el PSA se encuentra unido a inhibidores de la proteasa sérica. Una pequeña fracción del PSA sérico se encuentra libre (5 al 40%). Por tanto los niveles séricos del PSA reflejan los niveles totales, es decir, de PSA complejo y libre. Se ha demostrado que el porcentaje de PSA libre puede mejorar la especificidad al medir el PSA en el cáncer de próstata, de manera que altos porcentajes de niveles de PSA libre séricos están asociados menos al cáncer de próstata. Así, hombres con niveles de PSA entre 2.5 y 10 ng/ml con un porcentaje libre de PSA mayor del 25%, tendrán

sólo un 5% de riesgo de cáncer de próstata y puede disminuir hasta en un 20 a 30% de biopsias innecesarias de la misma. Un porcentaje menor del 10 de PSA es de mal pronóstico y es un alto indicador de cáncer de próstata. El uso más común de este test es en hombres con examen rectal digital normal y valores de PSA séricos entre 4 y 10 ng/ml<sup>37</sup>.

Los valores promedio de PSA y del ratio de PSA libre/ PSA total es de 7.8 ng/ml y 10.5% en los cáncer de próstata, 4.3 ng/ ml y 20.8% en pacientes con hiperplasia prostática benigna y de 1.4 ng/ ml y de 23.5% en el grupo de hombres de control sin hiperplasia prostática benigna<sup>37</sup>.

Han existido muchos intentos a la hora de agrupar las diferentes sumatorias de los patrones Gleason, con el intervalo de 2 a 10, se han hecho dos, tres y hasta cuatro categorías. Una práctica común ha sido la de agruparlos en las siguientes categorías<sup>53</sup>:

Carcinomas bien diferenciados: con sumatorias de Gleason 2-4.

Carcinomas moderadamente diferenciados: con sumatorias de Gleason 5-7.

Carcinomas pobremente diferenciados: con sumatorias de Gleason 8-10.

Pero debido a que la sumatoria de Gleason 7, es de agresividad intermedia y contiene elementos de alto grado, sería más apropiado considerar los siguientes grupos: 2-4 (bien diferenciado), 5-6(moderadamente diferenciado), 7(moderada a pobremente diferenciado) y 8-10(pobremente diferenciado)<sup>37, 53</sup>.

La correlación entre la sumatoria Gleason con los hallazgos de patología en la prostatectomía radical se resumen en la Tabla 12:<sup>37,45,53</sup>

El incremento en el grado de Gleason está directamente relacionado con algunas características histológicas importantes como la invasión linfo-vascular, el tamaño tumoral, los márgenes quirúrgicos positivos y el estadio patológico, incluyendo el riesgo de extensión extra prostática y de metástasis.<sup>45,53</sup>

**Tabla 12.** Correlación entre la sumatoria Gleason y los hallazgos patológicos en la prostatectomía radical.

Patología	Sumatoria Gleason			
	5	6	7	8-10
Extensión extra-prostática no focal	16%	24%	62%	85%
Márgenes positivos	20%	29%	48%	59%
Volumen tumoral promedio	2.2%	2.7%	5.1%	4.0%
Invasión de las vesículas seminales	1%	4%	17%	48%
Metástasis ganglionar	1%	2%	12%	24%

El grado histológico de las prostatectomías radicales es uno de los más poderosos, sino el más dominante, predictor de falla después de la cirugía y del resultado clínico en estos pacientes; unido a él tenemos otros parámetros como el estadio clínico, la respuesta al tratamiento, la falla bioquímica del PSA y su progresión a enfermedad metastásica, y la supervivencia al mismo<sup>45,53</sup>. Es la presencia de enfermedad de alto grado (Patrones de Gleason 4 o 5), que se consideran de mayor riesgo para el paciente y la cantidad de estos patrones tiene un gran impacto en la oportunidad de cura. Los carcinomas con Gleason 7 tienen un resultado intermedio entre los patrones Gleason 5-6 y los patrones Gleason 8-10; y dentro de la categoría 7, una sumatoria 4+3, tiene un peor pronóstico que una sumatoria 3+4<sup>45,53</sup>.

Los patrones de Gleason resultado de las prostatectomías son usados en modelos para predecir alto riesgo de recurrencia después de la cirugía. Estos modelos típicamente incorporan el patrón de sumatoria de Gleason, PSA sérico pre operatorio y estadio patológico, con o sin el volumen tumoral, y el estado de los márgenes<sup>53</sup>. Esta información para ayudar a dividir a los pacientes para consideración de una vigilancia cercana y/o quimioterapia adyuvante. Un modelo predice si la elevación del PSA después de la cirugía es debida a enfermedad local o a una metástasis a distancia. Este programa está basado en el



patrón de Gleason post prostatectomía radical y la velocidad de PSA postoperatorio, y es llamado Cálculo de Partin II<sup>53</sup>.

En este estudio se establecieron tres grandes grupos de acuerdo a su patrón de sumatoria de Gleason post prostatectomía radical, y puede apreciarse que aquellos carcinomas con una sumatoria Gleason 6, se presentaron en pacientes con estadios tumorales menores (T2), y que a medida que el Gleason aumentaba (7, 8 y 9) se incrementaba también su estadio tumoral, los niveles de PSA pre operatorios, el grado histológico, la positividad de los márgenes quirúrgicos y la edad (Gleason 8-9). Así, los pacientes dentro del Gleason 6, tuvieron tumores limitados a la próstata, sin extensión a los márgenes, vesículas seminales o ganglios linfáticos; mientras que en los otros dos grupos a medida que aumentaba el Gleason también aumentó la extensión a los márgenes (T3a) y la afección de las vesículas seminales (T3b), sin afectar en ninguno de los grupos los ganglios linfáticos; y en el seguimiento a los pacientes en varios meses, sólo aquellos con Gleason 7 y 8-9, sufrieron elevaciones del PSA post prostatectomía y necesitaron tratamiento con quimioterapia y/o radioterapia, siendo mayor el número de pacientes con el Gleason 8-9. Es decir, que los pacientes libres de la enfermedad fueron disminuyendo desde 100% (Gleason 6), a 66.6% (Gleason 8-9). Pero a pesar de ello, en el seguimiento a través del tiempo, sólo uno de los pacientes con un carcinoma de tipo no acinar, patrón Gleason 9 fue referido a cuidados paliativos y puede considerarse la única muerte debido al cáncer; el otro paciente con carcinoma patrón de Gleason 6 murió debido a un accidente cerebro vascular, causa no relacionada al cáncer. Por tanto, a pesar de los patrones de carcinomas pobremente diferenciados, la mortalidad sigue siendo baja si al paciente se le da el tratamiento adecuado, como se describe en la literatura en general<sup>8,27,53,63</sup>.

En cuanto a los niveles de PSA libre, en el grupo de Gleason 6 sólo se dejó de realizar en el 14.3% de los pacientes, pero a medida que aumentó el Gleason ese valor se transformó en 26.6% (Gleason 7) y 60% (Gleason 8-9), es decir, que en estos pacientes los niveles de PSA iniciales fueron mayores a 10 ng/ml. Esto limita la valoración del cociente, pero en el grupo de Gleason 6, donde se realizó a casi todos los pacientes, los valores nunca fueron menores del 10%.

## CATEGORÍA II: FACTORES PRONÓSTICOS RECOMENDADOS A PESAR DE DATOS INCOMPLETOS

### *Tipo Histológico*

El cáncer de próstata es típicamente el adenocarcinoma acinar de tipo usual, sólo una minoría de carcinomas prostáticos han sido clasificados como sus variantes, las cuales pueden variar en la apariencia morfológica y/o mostrar diferenciación divergente cuando se comparan con el tipo usual<sup>54</sup>.

Las variantes del adenocarcinoma acinar usual incluyen, de acuerdo a la clasificación del 2004 de la organización mundial para la salud (OMS), las siguientes categorías: atrófico, pseudohiperplásico, espumoso, coloide, en anillo de sello, oncocítico y carcinomas linfoepitelioides<sup>54</sup>.

Los carcinomas no usuales corresponden al 5-10% de todos los carcinomas prostáticos. Las variantes histológicas contempladas según la OMS tenemos para esta categoría tenemos: carcinoma sarcomatoide, adenocarcinoma ductal, carcinoma urotelial, carcinoma escamoso y adenoescamoso, carcinoma de células basales y tumores neuroendocrinos (carcinomas de células pequeñas y adenocarcinomas de células claras)<sup>54</sup>.

Recientemente, se han descrito nuevas variantes que no se encuentran descritas en la clasificación de la OMS 2004, y dentro de las cuales tenemos: el adenocarcinoma tipo neoplasia intraepitelial prostática (PIN), el carcinoma neuroendocrino de células grandes, y el carcinoma pleomórfico de células gigantes<sup>54</sup>.

El **adenocarcinoma ductal** también ha sido denominada bajo otros términos como son: endometrioide, endometrial, papilar o adenocarcinoma ductal papilar. Esta variante es la variante histológica más común del carcinoma prostático. La incidencia incluye el ductal puro y el mixto (adenocarcinoma ductal-acinar) y corresponde entre el 3.2% y el 5% de todos los cánceres de la próstata. La variante mixta es más común que la ductal pura<sup>37,54</sup>. Clínicamente aparece en edades comprendidas entre los 63 a 72 años y sus principales manifestaciones clínicas son: obstrucción y hematuria. El examen rectal es sospechoso o altamente sugestivo de malignidad. La mayoría de pacientes tienen altos niveles de PSA,

siendo una minoría que se presentan con niveles metastásicos de cientos o miles ng/ml. El grado histológico es usualmente alto, con patrón de Gleason 4, pero incomunmente patrones Gleason 3 y 5 pueden verse. Para la variante mixta un único patrón de Gleason debería ser dado. La determinación de Ki-67 es más alta que en lo adenocarcinomas acinares usuales. La extensión fuera de la próstata es de la misma forma que lo adenocarcinomas acinares puros. El patrón de crecimiento papilar y/o cribiforme puede involucrar tejidos blandos periprostáticos, vesículas seminales, ganglios linfáticos, y sitios distantes como pulmón y huesos; ésta forma tiene la particularidad que es propensa a dar metástasis a testículo, pene y pulmón. Las metástasis de los adenocarcinomas ductales mixtos, puede ser como ductal puro, acinar puro o en su forma mixta. El resultado para los hombres con adenocarcinoma ductal, en la mayoría de estudios, es peor que el de los hombres con adenocarcinoma prostático acinar, probablemente debido al alto estadio y alto grado<sup>37,54</sup>.

En nuestro estudio el 2.3% (1/44 casos) correspondió a los adenocarcinomas no ductales, y la variante histológica correspondió al tipo ductal; el paciente se presentó con niveles de PSA menores de 10 ng/dl, se le asignó a la prostatectomía un patrón Gleason 5+4, con márgenes quirúrgicos positivos e invasión a las vesículas seminales aunque sin dar metástasis a los ganglios linfáticos. El paciente se presentó al año de la prostatectomía con metástasis a hueso y pulmón, y fue tratado sólo con quimioterapia y luego remitido a cuidados paliativos, siendo el único paciente se presentó con un cuadro tan agresivo incluso comparado con los otros pacientes dentro del mismo grupo (todos acinares usuales), con niveles de PSA mayores al momento del diagnóstico, y misma categoría de Gleason y del TNM.

### **CATEGORÍA III: FACTORES PRONÓSTICOS NO RECOMENDADOS**

#### ***Marcadores Basales: Bcl-2, Citoqueratina 19***

Debido a que el cáncer de próstata se caracteriza por la pérdida de las células basales, no es de sorprendernos que por más de 25 años se ha buscado a aquellos marcadores que nos indiquen el origen basal del mismo<sup>60</sup>. Entre los marcadores más investigados tenemos:

citoqueratina 5/6, proteína p63 y la proteína p53<sup>60</sup>, pero también se proponen otras proteínas que están presentes en la próstata fetal como el Bcl-2 y la citoqueratina 19.

La función anti-apoptótica del Bcl-2 es regulada por varias señales que llevan al suicidio celular. El producto del gen del Bcl-2 es un potente inhibidor de la apoptosis, y se expresa en células hematopoyéticas, tejidos epiteliales y mesenquimales humanos<sup>11</sup>. La activación anormal del Bcl-2 contribuye a la transformación maligna y el desarrollo del cáncer<sup>60</sup>.

En la próstata fetal se encuentra la expresión del Bcl-2 en las células basales y ésta permanece en la próstata adulta en el compartimento basal pero desaparece en el luminal<sup>11, 65</sup>, lo cual nos indica que está relacionada con la proliferación celular.

En el cáncer de próstata la sobreexpresión de Bcl-2 está relacionada con pobre pronóstico y la quimioresistencia, ambas están asociadas a supresión de la muerte celular por prolongación del Bcl-2 en las células tumorales<sup>38</sup>. Resistencia a la apoptosis es crítica para las células neoplásicas a las que se les retira el andrógeno lo cual induce a la apoptosis. Datos de cánceres andrógeno dependientes sugieren el rol del Bcl-2 y su sobreexpresión<sup>38</sup>. Sin embargo, no se conoce si este es un evento temprano que favorece el desarrollo del cáncer o si ocurre con el bloqueo hormonal<sup>11,38</sup>. En el caso de los PIN se encuentra sobreexpresión de Bcl-2, pero no en el epitelio normal secretor, lo cual indica que está relacionada con el desarrollo temprano del cáncer de próstata<sup>11,38,48,60</sup>.

Así, la sobreexpresión de Bcl-2 está correlacionada con parámetros tumorales adversos como alta sumatoria Gleason, estado avanzado del tumor y gran volumen tumoral; además predice una alta recurrencia post cirugía<sup>38</sup>. Se ha propuesto que la sobreexpresión protege al cáncer de diferentes estímulos apoptóticos, incluyendo la ablación hormonal, radioterapia y quimioterapia<sup>55</sup>, y por tanto reducir los niveles de proteína Bcl-2 incrementarán la sensibilidad de las células tumorales ante los agentes citotóxicos<sup>55</sup>.

En un estudio realizado por Fleischmann y colaboradores, obtuvieron que la sobreexpresión de Bcl-2 fuera mayor en tumores con Gleason altos, estadios avanzados y alta actividad mitótica<sup>38</sup>. En nuestro estudio la expresión de Bcl-2 en el grupo de Gleason 6 y 7, y en las categorías de PIN fue similar, con expresión homogénea y fuerte en las células

basales, pero con expresión heterogénea a nivel luminal, mientras que en las células neoplásicas fue prácticamente negativa. Pero los resultados son diferentes para el grupo de Gleason 8-9, en la categoría de PIN ya encontramos tumores que no expresaron Bcl-2 basal, pero las células lumbinales de todos los tumores evaluados tienen expresión positiva aunque heterogénea, y en las células neoplásicas ya el 40% de los tumores expresaron dicha proteína, lo cual nos indica que dicho patrón de expresión está ligado a mayor agresividad de dichos tumores, y que se evidencia en el mayor porcentaje de pacientes que tuvieron que ser tratados con quimioterapia y/o radioterapia en este grupo (Gleason 8-9) y que este fue el único grupo que tuvo una muerte relacionada debido al cáncer, a pesar de ello, el único paciente que tuvo mal pronóstico, con un adenocarcinoma ductal no expresó Bcl-2 en las células neoplásicas, lo que indicaría que esta variante no tiene origen basal; todo lo anterior nos sugiere que la búsqueda de la expresión de Bcl-2 en las células tumorales pueden ser un indicador importante de factor pronóstico y que en el caso de la categoría del PIN estos empiezan a tener características de expresión semejantes a sus contrapartes malignas. Además, nos sugiere que como factor predictivo un buen grupo de estas neoplasias serán hormono-resistentes en el futuro y podrán dar metástasis además de recurrencias locales.

Por otro lado la expresión de la citoqueratina 19 se observa en todas las células epiteliales fetales, pero se encuentra restringida en la próstata adulta al compartimento basal, respetando las células lumbinales<sup>65</sup>. En la próstata fetal se piensa que las células citoqueratina 19 positivas representan a aquella población celular en proceso de diferenciación y que tiene un estado intermedio entre la célula basal y la luminal<sup>65</sup>. Además su expresión no es idéntica en toda la próstata neonatal, lo que sugiere que al nacimiento no se ha alcanzado diferenciación completa del compartimento luminal y por tanto tampoco se ha diferenciado completamente todo el órgano<sup>65</sup>.

En nuestro estudio la expresión de citoqueratina 19, en la categoría de PIN para los tres grupos de Gleason es muy semejante, así tenemos que las células basales expresan de manera fuerte y homogénea dicha proteína, y que además a nivel luminal también se expresa la proteína aunque con un patrón más heterogéneo, lo que nos indica que las células del PIN tienen una expresión no de una próstata adulta, sino que nos recuerda a la

próstata fetal con una diferenciación intermedia entre ambos compartimentos (basal y luminal). Por otro lado, en las células neoplásicas de los tres grupos encontramos una expresión variable, pero en los Gleason 7 y 8-9, empezamos a encontrar tumores que dejan de expresarla, comportándose más como una próstata adulta, es decir, perdiendo sus características fetales. De esta manera, parece que la expresión de citoqueratina 19 es más útil a la hora de diferenciar lesiones preneoplásicas, las cuales han perdido las características del epitelio maduro normal, que como factores pronósticos o predictivos.

### ***Marcadores de Proliferación: Ki-67, Índice de Proliferación***

En la próstata fetal, las yemas sólidas expresan índices de proliferación con rangos, que varían desde 10 a 45%, con un promedio de 21%. En las glándulas ya organizadas, el promedio de Ki-67 fue de 8%<sup>65</sup>, con una marcada disminución cuando se compara con las yemas epiteliales sólidas. En las glándulas ya canalizadas se encontraron células proliferativas tanto en el compartimento basal como en el luminal<sup>65</sup>. En las glándulas de la próstata adulta, la tasa de proliferación epitelial siempre es siempre menor al 5%, y las células proliferativas estuvieron restringidas al compartimento basal<sup>65</sup>.

Aproximadamente el 70% de toda la actividad proliferativa de la próstata humana se encuentra dentro de la capa basal, pero se ha establecido que incremento en la proliferación se observa en el epitelio glandular atrófico de la próstata<sup>143</sup>. Como la atrofia glandular es frecuentemente asociada con la inflamación crónica, el término atrofia inflamatoria proliferativa ha sido propuesto para esta lesión<sup>143</sup>, y se ha visto que la expresión de Ki-67 se encuentra a nivel luminal<sup>143</sup>.

El incremento en la proliferación celular es la característica de todas las neoplasias malignas, y por tanto la piedra angular de la quimioterapia convencional. En el cáncer de próstata numerosos estudios han demostrado ser de valor pronóstico<sup>60</sup>. El Ki-67 es pronóstico para determinar la muerte de los pacientes, caída bioquímica de los niveles de PSA en pacientes con prostatectomía radical y progresión de la enfermedad. En muchos de los estudios la expresión de Ki-67 tiene un valor pronóstico independiente, lo cual implica que su valor es adicional al patrón de Gleason y los niveles de PSA. A pesar de todo lo

anterior su utilidad se ha visto limitada inicialmente por determinar el uso de un único anticuerpo, problema que fue rápidamente superado por el uso de la proteína Ki-67, pero con todavía la limitación de cuales valores serán aceptados como anormales, cuando presenta rangos que pueden variar de 5 a 10% en algunos cohortes, y que se agrava por el hecho que el cáncer de próstata tiene un bajo índice de proliferación<sup>60</sup>. Todo lo anterior ha resultado en difícil comparación entre todos los estudios<sup>60</sup>. Por otro lado, una tercera razón para su utilización es la ausencia de verdaderos estudios prospectivos dentro de varias formas de tratamiento, que permitan la vigilancia de la cirugía frente a la radioterapia<sup>60</sup>.

F. Barbisan y colaboradores, determinaron en sus estudios que los índices de proliferación fueron mayores en las áreas atróficas y en los PIN de alto grado, y que por tanto ambas patologías debían considerarse como precursoras del cáncer<sup>5</sup>. S. Hailemariam y colaboradores, determinaron en su estudio que altos niveles de Ki-67, definidos como mayores de 10% en 26% de los PIN de alto grado, estuvieron asociados al cáncer lo cual es poco significativo<sup>48</sup>.

Madani y colaboradores, concluyeron que el Ki-67 marcó positivo en 35 de sus 49 casos (71.4%), mostrando una significantes relación entre el índice de proliferación y el valor de Gleason de los tumores de bajo a alto grado de diferenciación<sup>73</sup>. Nilson y colaboradores, mostraron significativa correlación entre los casos positivos de Ki-67 y también la diferenciación celular. Todos los tumores pobremente diferenciados, poco menos de la mitad de los moderadamente diferenciados y sólo unos pocos tumores bien diferenciados fueron positivos para Ki-67 en su estudio. Este estudio también mostró que la expresión de Ki-67 es fuertemente indicativa de cáncer de próstata, y que podía encontrarse tanto a nivel basal como luminal<sup>73</sup>. Nagao y colaboradores, determinaron que datos de Ki-67 en pacientes con valores de PSA entre 2.6-4 y 10.1-20 ng/dl, fueron similares lo cual sugiere que un número importante de pacientes con niveles de PSA normales pueden tener cánceres agresivos que deben ser tratados inmediatamente<sup>95</sup>.

Nuestros resultados no fueron muy diferentes a los ya descritos anteriormente. Los PIN del grupo de Gleason 6 presentaron predominantemente índices menores al 5%, comportándose prácticamente como tejido prostático maduro; y las células neoplásicas de

este mismo grupo presentaron índices menores al 20%, lo cual hace un comportamiento intermedio entre una próstata normal y una fetal. Pero a partir del aumento del Gleason, aunque los PIN se mantienen por debajo del 20%, en las células neoplásicas ya encontramos un mayor número de tumores con índices mayores al 20%, es decir, con rangos muy proliferativos poco característicos de la próstata normal y más sugerente de tejidos fetales y/o neoplásicos. El único caso que presentó un índice de proliferación alto, de aproximadamente el 80%, fue un adenocarcinoma no acinar, variante ductal, cuyos índices se reportan más altos que lo habitual<sup>37,54</sup> incluso con los comparados de otros pacientes en la misma categoría Gleason.

A pesar que los índices de proliferación siguen siendo un poco mayores en los tumores pobremente diferenciados de la próstata, una de las grandes limitantes del Ki-67 como factor predictivo y pronóstico es el hecho que el tejido prostático como tal tienen un bajo índice de proliferación aún cuando es neoplásico, e incluso no puede correlacionarse con los niveles de PSA o con la sumatoria Gleason, ya que podemos tener niveles normales de PSA con neoplasia prostática presente. Aunque si es una herramienta pronóstica en aquellos adenocarcinomas no acinares, ya que corresponden altos índices con alta agresividad y pronóstico malo.

### ***Receptor de Andrógenos***

La próstata es un órgano andrógeno dependiente, que reduce su tamaño dramáticamente bajo la deprivación androgénica<sup>62,108,124,143</sup>.

Las células adultas lumbinales expresan proteínas secretoras y despliega altos niveles de receptores de andrógenos (RA), éstos últimos no se expresan durante la vida fetal, ni en las células basales adultas, pero si en algunas células estromales que permiten mantener un ambiente adecuado para el tejido prostático normal y el neoplásico<sup>57,62,65,108,124,143</sup>. Las células basales adultas carecen de actividad secretora y no dependen del andrógeno para su supervivencia. El RA juega un papel central en la función de la próstata normal y en el apareamiento de la enfermedad de terapia resistente ante el cáncer<sup>57,62,108,124,143</sup>. En algunos modelos de estudio la regeneración y regresión en modelos de ratones se encuentre



tan pronto luego de 30 rondas de deprivación androgénica y sustitución, de manera que el tratamiento androgénico puede restablecer completamente la arquitectura normal de la próstata ventral<sup>57,62,108,124,143</sup>. Durante este proceso las células que han sobrevivido son las basales y se ha barrido el 90% aproximadamente de las lumbinales a través de la apoptosis<sup>57,62,108,124,143</sup>. El epitelio superviviente parece ser el responsable de la independencia androgénica y se caracteriza porque responde al tratamiento exógeno androgénico, que puede ser andrógenos producidos por la glándula suprarrenal y probablemente la próstata, donde se piensa que el tejido se vuelve más sensitivo a los andrógenos a través de la amplificación del RA<sup>57,62,108,124,143</sup>. Se piensa que las células madres prostáticas normales son insensibles a los andrógenos o carecen de receptores de andrógenos, sin embargo son células capaces de producir células adultas capaces de expresar dicho receptor<sup>57,108,124,143</sup>. El rol de las células madres en la metástasis y enfermedad resistente a la terapia permanece aún bajo investigación, una de las hipótesis es que la recurrencia es causada por la supervivencia de éstas células, las cuales mantienen o ganan la propiedad de auto-renovación<sup>57,62,108,124,143</sup>.

Bonkhoff y colaboradores, concluyeron que la expresión diferencial de Bcl-2 y RA en el sistema epitelial prostático también refleja la susceptibilidad divergente de las células basales y lumbinales a los andrógenos lumbinales. La no reactividad del Bcl-2 de las células secretoras lumbinales y la fuerte expresión luminal de RA, contrasta con la expresión de las células basales que expresan altos niveles de Bcl-2 frente a niveles bajos a ausente de RA<sup>11</sup>. En el caso del PIN, la sobreexpresión de Bcl-2 en las células lumbinales mostró marcada disminución de expresión de RA. Estas lesiones pre-malignas pueden llegar a ser más resistentes a la muerte células apoptótica dependiente de andrógeno que las áreas donde los niveles de Bcl-2 son normales y restringidos a las células basales; finalmente, las lesiones cancerosas adyacentes a las áreas de PIN carecen de expresión a Bcl-2, pero expresan fuertemente el RA nuclear<sup>11</sup>.

La correlación inversa de Bcl-2 y el estatus del RA observado en la próstata benigna, lesiones pre-malignas y en los estadios tempranos del cáncer sugieren fuertemente la

relación funcional entre los factores reguladores que controlan la expresión de RA y del gen de Bcl-2<sup>11</sup>.

En este trabajo los resultados no fueron muy diferentes de los estudios antes mencionados, en las áreas de PIN las células basales fueron prácticamente negativas para la expresión nuclear del RA, siendo positivas sólo en dos casos Gleason 7, que según algunas investigaciones podría indicar una sobreexpresión ya anómala del receptor<sup>57,62,108,124,143</sup>. A nivel luminal, a pesar de lo que podría esperarse, la expresión no fue totalmente homogénea, como era de esperarse en el tejido prostático normal, siendo predominante el patrón heterogéneo de expresión, casi igual al patrón de expresión de las células neoplásicas malignas, por tanto, tanto en las áreas de PIN como en las neoplásicas la expresión es anormal.

No podemos relacionar una mayor expresión con mayor agresividad, porque así como el único adenocarcinoma ductal expresó fuerte y homogéneamente el RA, así otros tumores más clásicos, tipo acinar, lo expresaron igual.

### ***Marcadores de Apoptosis: Expresión Nuclear de Proteína p27***

La expresión de inhibidores de ciclina dependiente de cinasa (CDK) p16 y p27 se ha asociado con la progresión del cáncer de próstata. La proteína p27 regula negativamente la proliferación celular por arresto del ciclo celular en la fase G1.

En la próstata fetal la expresión de p27 estuvo ausente en todas las células epiteliales, mientras que en la próstata adulta se expresa difusamente en el compartimento luminal y focalmente en el compartimento basal<sup>65</sup>.

Se ha sugerido que la disminución en la expresión de p27 puede contribuir al desarrollo de las neoplasias malignas debido a la pérdida del mecanismo crítico anti-proliferativo<sup>134</sup>. La pérdida de la expresión de p27 en cáncer de próstata está correlacionada con agresividad histológica y progresión tumoral<sup>134</sup>. Aún así, en estudios realizados por Vlachostergios y colaboradores concluyeron que la positividad de p27 no correlacionaba con el patrón de Gleason, ni con la recaída de los valores del PSA<sup>134</sup>.

En nuestro estudio la proteína p27, en el grupo de Gleason 6, en la categoría del PIN dejó de expresarse a nivel basal (64.4%), aunque siempre se expresó a nivel luminal, y en las células neoplásicas. La misma situación se presentó en los otros dos grupos, en donde en el grupo de Gleason 7 la ausencia de expresión a nivel basal bajo a 40%; y en el grupo Gleason 8-9 la ausencia de expresión bajo a 20% a nivel basal; manteniéndose la expresión a nivel luminal y en las células neoplásicas. Todo lo anterior no correlaciona definitivamente con el patrón de Gleason y sus características, ya que la expresión ha resultado inversa, es decir, se expresa menos en las células basales a medida que la neoplasia es bien diferenciada y se expresó más en los tumores pobremente diferenciados, lo cual nos indica que la disminución de su expresión no correlaciona con la agresividad histológica y la progresión tumoral. Además, la expresión en las áreas de PIN sigue manteniendo el patrón de la próstata adulta normal, mientras que en las células neoplásicas la expresión es siempre de tipo luminal y no basal, con lo que podríamos decir que mantiene las características luminales de la célula que le dio origen.

## **CONCLUSIONES**

## CONCLUSIONES

**Primera:** El carcinoma de la próstata en nuestros diferentes grupos de estudios, divididos por los patrones Gleason 6, 7 y 8-9, tiene el comportamiento epidemiológico esperado por grupo en cuanto a la edad de presentación, niveles de PSA preoperatorio, estadios de TNM por grupo, grado histológico, estado de los márgenes y evolución de los pacientes.

**Segunda:** El carcinoma de próstata de tipo acinar usual fue el patrón más común, y a pesar de que se estudiaron casos con patrones Gleason 8-9, menos diferenciados y más asociados a agresividad, ninguno de los pacientes murió debido al cáncer. El único paciente con pobre evolución fue uno del grupo Gleason 8-9, con patrón histológico de tipo no acinar, tipo ductal (endometriode).

**Tercera:** En relación a los marcadores de inmunohistoquímica para el fenotipo basal, sólo la expresión de Bcl-2 parece estar relacionada como un factor pronóstico negativo, ya que los tumores que los expresaron estaban más relacionados con recaída bioquímica y tuvieron necesidad del uso de la radioterapia. En cuanto a la expresión de la citoqueratina 19, parece ser más útil para diferenciar entre las lesiones preneoplásicas de las neoplásicas.

**Cuarta:** El índice de proliferación es mayor a medida que los tumores son menos diferenciados y tienen patrones de Gleason 8-9, pero una de las grandes limitantes es que el tejido prostático tiene un bajo índice de proliferación incluso cuando es neoplásico, y no corresponden sus índices a niveles de PSA preoperatorios, patrón de Gleason o estadio de TNM.

**Quinta:** La expresión del receptor de andrógeno y de expresión nuclear de p27, no resultaron útiles como factores pronósticos en la evolución del carcinoma de próstata.

**Sexta:** En el carcinoma de próstata el patrón de sumatoria de Gleason sigue siendo el arma más útil de pronóstico en la evolución de los pacientes, los marcadores de

inmunohistoquímica y moleculares todavía deben seguirse estudiando en busca de conseguir factores pronósticos que sean de utilidad en la evolución del cáncer de próstata.



## RESUMEN

**Introducción.** El cáncer de próstata se considera el sexto cáncer más frecuente en el mundo y, el más común, en los Estados Unidos y otros países industrializados; este cáncer, junto con el de pulmón y colon, son las neoplasias malignas más frecuentes en el hombre, constituyendo una de las principales causas de muerte. Se caracteriza por ser un tumor multifocal, no clonal y heterogéneo, localizado en la zona periférica de la próstata (70%), pero con una tasa de mortalidad del 3%. Entre los factores de riesgo se encuentran: la edad, y la presencia de andrógenos, seguidos por los factores dietéticos, la predisposición familiar y los procesos inflamatorios prostáticos; en los últimos años, también se ha identificado el componente hereditario relacionado con dicho cáncer. A pesar de los avances en la detección temprana del cáncer de próstata y de la instauración de la terapia de deprivación andrógena (TDA), se ha observado que existe una cantidad considerable de pacientes con enfermedad avanzada o metastásica que inicialmente responden a la TDA, pero que se vuelven resistentes a la misma.

Se ha propuesto que existe un grupo de tumores, entre ellos el de próstata, que contienen cierto tipo de células que actúan como células madre, y se caracteriza por la capacidad ilimitada de autogeneración, tasa baja de proliferación y la habilidad de diferenciarse en ciertas células tumorales proliferantes; razón por la cual se ha dicho que tratar a las células tumorales ya desarrolladas no es suficiente, sino que deben desarrollarse métodos de diagnóstico y tratamientos dirigidos a identificar y erradicar a estas células madre tumorales, que son las responsables de la perpetuación del cáncer.

**Objetivos.** Determinar la localización de la expresión de proteínas basales (ck19, Bcl-2 y Ki67), receptor de andrógeno y de p27 en tejidos con cáncer de próstata y PIN de alto grado.

**Material y Métodos.** Para el estudio se seleccionaron al azar, de la base de datos del Departamento de Anatomía Patológica del Hospital La Paz de Madrid, 44 casos de adenocarcinoma de próstata diagnosticados entre los años 2005 y 2009. Se dividieron los casos en tres grandes grupos de acuerdo al valor de escala de Gleason diagnosticada, de manera que en el primer grupo se encuentran los adenocarcinomas Gleason 6 (14 casos); el segundo grupo comprende los adenocarcinomas Gleason 7 (15 casos); y el tercer grupo

comprende los adenocarcinomas con los Gleason 8 - 9 (15 casos). Se revisaron todas las láminas pertenecientes a los casos teñidas con hematoxilina y eosina, y se escogió, de cada caso, una lámina que tuviera en la misma muestra áreas de tejido con neoplasia intraepitelial prostática de alto grado (PIN de alto grado) y áreas representativas del tumor y de la escala Gleason a la que pertenecían (20 Gleason 3, 15 Gleason 4 y 9 Gleason 5). Se realizó inmunohistoquímica para la determinación de las proteínas basales (citoqueratina 19, proteína Bcl-2 y Ki67), el receptor de andrógeno (RA) y la proteína p27, y se comparó la expresión de todas ellas a nivel de las áreas de PIN (células basales y lumbinales) y las células neoplásicas adyacentes.

**Resultados.** El comportamiento epidemiológico fue el esperado para todos los grupos (edad, niveles de PSA preoperatorio, estadio TNM, grado histológico, márgenes y evolución de los pacientes); el tipo histológico más común fue el acinar, y el único paciente con el tipo no acinar (endometriode) tuvo un mal pronóstico. En cuanto a las proteínas basales, la única que parece tener valor pronóstico es la expresión de Bcl-2, mientras que la citoqueratina 19, proteína p27 y el Ki-67 resultaron inespecíficos. El receptor de andrógeno se expresó en las células lumbinales del PIN y en las neoplásicas pero careció de valor pronóstico.

**Conclusiones.** En el carcinoma de próstata el patrón de sumatoria de Gleason sigue siendo el arma más útil de pronóstico en la evolución de los pacientes, los marcadores de inmunohistoquímica y moleculares todavía deben seguirse estudiando en busca de conseguir factores pronósticos que sean de utilidad en la evolución del cáncer de próstata.

## SUMMARY

**Introduction.** Prostate cancer is considered the sixth most common cancer worldwide and the most common in the United States and other industrialized countries, this cancer, along with lung and colon are the most common malignancies in man, constituting one of the main causes of death. It is characterized as a tumor multifocal, heterogeneous clonal, not located in the peripheral zone of the prostate (70%), but with a mortality rate of 3%. Among the risk factors are: age, and the presence of androgens, followed by dietary factors, as well as familial predisposition and prostatic inflammatory processes. In recent years has also been identified hereditary component related to the prostatic carcinoma. Despite advances in early detection of prostate cancer and the establishment of androgen deprivation therapy (ADT), it has been observed that there is a considerable amount of patients with advanced or metastatic disease who initially respond to the TDA, but that are resistant to it.

It has been proposed that a group of tumors, including prostate cancer, which contain certain types of cells acting as stem cells, that characterized by self-generation unlimited capacity, low proliferation rate and the ability to differentiate into certain cells proliferating tumor. Treating tumor cells already developed is not enough, but that methods of diagnosis and treatments aimed to identify and eradicate these tumor stem cells, which are responsible for the perpetuation of cancer.

**Objectives.** Determining the location of the basal protein expression (CK19, Bcl-2), androgen receptor, p27 and Ki67 in prostate cancer tissues and high grade PIN.

**Material and Methods.** For the study were randomly selected from the database of the Department of Pathology of the Hospital La Paz, Madrid, 44 cases of prostate cancer diagnosed between 2005 and 2009. Cases were divided into three groups according to the value of Gleason diagnosed, of so that in the first group are Gleason 6 adenocarcinoma (14 cases), the second group comprises adenocarcinomas Gleason 7 (15 cases), and the third group includes adenocarcinomas with Gleason 8-9 (15 cases). We reviewed all slides belonging to cases stained with hematoxylin and eosin, and was chosen from each case, a slide that would take the same sample tissue areas with high-grade intraepithelial neoplasia grade (HGPIN) and representative areas of the tumor and the Gleason scale to which they

belonged (20 Gleason 3, 15 Gleason 4 and 9 Gleason 5). Immunohistochemistry was performed to determine the basal protein (cytokeratin 19, Bcl-2 and), the androgen receptor (AR), p27 protein and Ki67 proliferative marker. The expression level of all of the areas of PIN (basal and luminal cells) and neoplastic cells adjacent were compared.

**Results.** The epidemiological behavior was expected for all groups (age, preoperative PSA levels, TNM stage, grade, margins and patient outcomes). The most common histological type was the acinar, and the only patient with no acinar type (endometrioid) had a poor prognosis. As basal proteins, the only one that seems to have prognostic value is the expression of Bcl-2. On the other hand, cytokeratin 19, p27 protein and Ki-67 were nonspecific. The androgen receptor is expressed in the luminal cells of PIN and in neoplastic cells, but lacked prognostic value.

**Conclusions.** In prostate carcinoma, the Gleason pattern remains the most useful weapon in the prognosis of the patients evolution; immunohistochemical and molecular markers should be further explored still looking to get prognostic factors that could be useful in the evolution of prostate cancer.



## REFERENCIAS

1. **Abe T, Hayashi T, Nakayama J, Kishikawa H, Sekii K, Yoshioka T, Itatani H, Kojima Y, Takahara S.** A case of synchronous double primary cancers of prostate, and bladder in a hemodialysis patient: a case report. **Acta Urol Jpn** 2005;51:689-93.
2. **Abou-Kheir WG, Hynes PG, Martin PL, Pierce R, Kelly K.** Characterizing the contribution of stem/progenitor cells to tumorigenesis in the Pten-/-TP53-/- prostate cancer model. **Stem Cells** 2010;28:2129-40.
3. **Al-Hussain TO, Epstein JI.** Initial high-grade prostatic intraepithelial neoplasia with carcinoma on subsequent prostate needle biopsy: findings at radical prostatectomy. **Am J Surg Pathol** 2011;35:1165-7.
4. **Anvari K, Seilanian Toussi M, Kalantari M, Naseri S, Karimi Shahri M, Ahmadnia H, Katebi M, Sedighi Pashaki A, Dayani M, Broumand M.** Expression of bcl-2 and bax in advanced or metastatic prostate carcinoma. **Urol J** 2012;9:381-8.
5. **Barbisan F, Mazzucchelli R, Santinelli A, Scarpelli M, Lopez-Beltran A, Cheng L, Montironi R.** Expression of prostate stem cell antigen in high-grade prostatic intraepithelial neoplasia and prostate cancer. **Histopathology** 2010;57:572-9.
6. **Bianchi-Frias D, Vakar-Lopez F, Coleman IM, Plymate SR, Reed MJ, Nelson PS.** The effects of aging on the molecular and cellular composition of the prostate microenvironment. **PLoS One** 2010;5. pii: e12501.
7. **Bjartell A, Montironi R, Berney DM, Egevad L.** Tumour markers in prostate cancer II: diagnostic and prognostic cellular biomarkers. **Acta Oncol** 2011;50 Suppl 1:76-84
8. **Billis A, Guimaraes MS, Freitas LL, Meirelles L, Magna LA, Ferreira U.** The impact of the 2005 international society of urological pathology consensus conference on standard Gleason grading of prostatic carcinoma in needle biopsies. **J Urol** 2008;180:548-52.
9. **Bluemn EG, Nelson PS.** The androgen/androgen receptor axis in prostate cancer. **Curr Opin Oncol** 2012;24:251-257.
10. **Bonaccorsi L, Muratori M, Marchiani S, Forti G, Baldi E.** The androgen receptor and prostate cancer invasion. **Mol Cell Endocrinol** 2006;246:157-62.
11. **Bonkhoff Helmut, Fixemer T, Remberger K.** Relation between Bcl-2, Cell Proliferation, and the Androgen Receptor Status in Prostate Tissue and Precursors of Prostate Cancer. **Prostate** 1998; 34: 251-258.
12. **Bosland MC, Mahmoud AM.** Hormones and prostate carcinogenesis: Androgens and estrogens. **J Carcinogen** 2011;10:33.
13. **Bostwick DG.** Progression of prostatic intraepithelial neoplasia to early invasive adenocarcinoma. **Eur Urol** 1996;30:145-52.
14. **Bostwick DG, Cheng L.** Precursors of prostate cancer. **Histopathology** 2012;60:4-27.
15. **Bostwick DG, Qian J.** High-grade prostatic intraepithelial neoplasia. **Mod Pathol** 2004;17:360-79.
16. **Botelho F, Pina F, Figueiredo L, Cruz F, Lunet N.** Does baseline total testosterone improve the yielding of prostate cancer screening? **Eur J Cancer** 2012;48:1657-1663.
17. **Braun M, Perner S.** High-grade prostatic intraepithelial neoplasia: the only accepted prostate cancer precursor lesion. **Pathologe** 2011;32 Suppl 2:237-41.

18. **Brown MD, Gilmore PE, Hart CA, Samuel JD, Ramani VA, George NJ, Clarke NW.** Characterization of benign and malignant prostate epithelial Hoechst 33342 side populations. **Prostate** 2007; 67: 1384-96.
19. **Cardillo MR, Di Silverio F, Gentile V.** Quantitative immunohistochemical and in situ hybridization analysis of metalloproteinases in prostate cancer. **Anticancer Res** 2006; 26: 973-82.
20. **Ceder JA, Jansson L, Ehrnström RA, Rönstrand L, Abrahamsson PA.** The characterization of epithelial and stromal subsets of candidate stem/progenitor cells in the human adult prostate. **Eur Urol** 2008; 53;524-531.
21. **Chastain EC, Oliva IV, Osunkoya AO.** Utility of p63 and high molecular weight cytokeratin in the distinction between urothelial carcinoma with prostatic stromal invasion and urothelial carcinoma with colonisation of prostatic ducts and acini. **Pathology** 2012;44:199-203.
22. **Corcoran NM, Casey RG, Hong MK, Pedersen J, Connolly S, Peters J, Harewood L, Gleave ME, Costello AJ, Hovens CM, Goldenberg SL.** The ability of prostate-specific antigen (PSA) density to predict an upgrade in Gleason score between initial prostate biopsy and prostatectomy diminishes with increasing tumour grade due to reduced PSA secretion per unit tumour volume. **BJU Int** 2012;110:36-42.
23. **Cunha GR, Hayward SW, Wang YZ, Riche WA.** Role of the stromal microenvironment in carcinogenesis of the prostate. **Int J Cancer** 2003;107:1-10.
24. **Culp S, Porter M.** The effect of obesity and lower serum prostate-specific antigen levels on prostate-cancer screening results in American men. **BJU Int.** 2009;104:1457-61.
25. **Dabbs, David.** Diagnostic Immunohistochemistry. Second Edition. 2006. Churchill Livingstone Elsevier. Pg: 618-621.
26. **Davis LD, Zhang W, Meseburger A, Young D, Xu L, Rhim JS, Moul JW, Srivasta S, Sesterhenn IA.** P63 expression profile in normal and malignant prostate epithelial cells. **Anticancer Res** 2002;22:3819-25.
27. **Delahunt B, Miller RJ, Srigley JR, Evans AJ, Samaratunga H.** Gleason grading: past, present and future. **Histopathology** 2012;60:75-86.
28. **de La Taille A, Houlgatte A, Houdelette P, Berlizot P, Fournier R, Ricordel I.** The incidence of the variability of the free PSA/total PSA ratio on the early diagnosis of prostate cancer. **Prog Urol** 1997;7:455-63.
29. **Di Como CJ, Urist MJ, Babayan I, Drobnjak M, Hedvat CV, Teruya-Feldstein J, Pohar K, Hoos A, Cordon-Cardo C.** p63 expression profiles in human normal and tumor tissues. **Clin Cancer Res** 2002; 8:494-501.
30. **Djavan B, Milani S, Remzi M.** Prostate biopsy: who, how and when. An update. **Can J Urol** 2005;12 Suppl 1:44-8.
31. **Djavan B, Fong YK, Ravery V, Remzi M, Horninger W, Susani M, Kreuzer S, Boccon-Gibod L, Bartsch G, Marberger M.** Are repeat biopsies required in men with PSA levels < or =4 ng/ml? A Multiinstitutional Prospective European Study. **Eur Urol** 2005;47:38-44.
32. **Eade TN, Al-Saleem T, Horwitz EM, Buyyounouski MK, Chen DY, Pollack A.** Role of radiotherapy in ductal (endometrioid) carcinoma of the prostate. **Cancer** 2007;109:2011-5.
33. **Egevad L.** Handling of radical prostatectomy specimens. **Histopathology** 2012, 60, 118-124.

34. **Epstein JI.** An update of the Gleason grading system. *J Urol* 2010;183:433-40.
35. **Epstein JI, Feng Z, Trock BJ, Pierorazio PM.** Upgrading and Downgrading of Prostate Cancer from Biopsy to Radical Prostatectomy: Incidence and Predictive Factors Using the Modified Gleason Grading System and Factoring in Tertiary Grades. *Eur Urol* 2012;61:1019-1024.
36. **Epstein JI, Herawi M.** Prostate needle biopsies containing prostatic intraepithelial neoplasia or atypical foci suspicious for carcinoma: implications for patient care. *J Urol* 2006;175:820-34.
37. **Epstein, J. Netto GJ.** Biopsy Interpretation of the Prostate. Fourth Edition. 2008. Lippincott, Williams & Wilkins. Pag: 35-67.
38. **Fleischmann A, Huland H, Mirlacher M, Wilczak W, Simon R, Erbersdobler A, Sauter G, Schlomm T.** Prognostic relevance of Bcl-2 overexpression in surgically treated prostate cancer is not caused by increased copy number or translocation of the gene. *Prostate* 2011 Oct 24. doi: 10.1002/pros.21504.
39. **Foster CS, Bostwick DG, Bonkoff H, Damber JE, van der Kwast T, Montironi R, Sakr WA.** Cellular an molecular pathology of prostate cancer precursors. *Scand J Urol Nephrol* 2000;(205: 19-43.
40. **Funahashi Y, Kamihira O, Kasugai S, Kimura K, Fukatsu A, Matsuura O.** Triple cancer in the urinary system: a case report. *Acta Urol Jpn* 2007;53:813-5.
41. **Fuzio P, Ditunno P, Lucarelli G, Battaglia M, Bettocchi C, Senia T, Perlino E.** Androgen deprivation therapy affects BCL-2 expression in human prostate cancer. *Int J Oncol* 2011;39:1233-42.
42. **Gan L, Chen S, Wang Y, Watahiki A, Bohrer L, Sun Z, Wang Y, Huang H.** Inhibition of the androgen receptor as a novel mechanism of taxol chemotherapy in prostate cancer. *Cancer Res* 2009;69:8386-94.
43. **Gottlieb B, Beitel LK, Nadarajah A, Paliouras M, Trifiro M.** The androgen receptor gene mutations database: 2011 update. *Hum Mutat* 2012;33:887-894.
44. **Gravdal K, Halvorsen OJ, Haukaas SA, Akslen LA.** A switch from E-cadherin to N-cadherin expression indicates epithelial to mesenchymal transition and is of strong and independent importance for the progress of prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2007; 13:7003-11.
45. **Guimaraes MS, Quintal MM, Meirelles LR, Magna LA, Ferreira U, Billis A.** Gleason score as predictor of clinicopathologic findings and biochemical (PSA) progression following radical prostatectomy. *Int Braz J Urol* 2008;34:23-9.
46. **Grizzle WE, Srivastava S, Manne U.** The biology of incipient, pre-invasive or intraepithelial neoplasia. *Cancer Biomarkers* 2011;9:21-39.
47. **Hameed O, Humphrey PA.** Immunohistochemistry in diagnostic surgical pathology of the prostate. *Sem Diagn Pathol* 2005;22:88-104.
48. **Hailemariam S, Vosbeck J, Cathomas G, Zlobec I, Mattarelli G, Eichenberger T, Zellweger T, Bachmann A, Gasser TC, Bubendorf L.** Can molecular markers stratify the diagnostic value of high-grade prostatic intraepithelial neoplasia?. *Hum Pathol* 2011;42:702-9.
49. **Helpap B, Egevad L.** Modified Gleason grading. An updated review. *Histol Histopathol* 2009;24:661-6.
50. **Helpap B, Oehler U.** Importance of second opinions on histology of prostate biopsy specimens. *Pathologe* 2012;33:103-12.

51. **Huang J, Yao JL, di Sant'Agnese PA, Yang Q, Bourne PA, Na Y.** Immunohistochemical characterization of neuroendocrine cells in prostate cancer. **Prostate** 2006;66:1399-406.
52. **Hudson DL, Guy AT, Fry P, O'Hare MJ, Watt FM, Masters JR.** Epithelial cell differentiation pathways in the human prostate: identification of intermediate phenotypes by keratin expression. **J Histochem Cytochem** 2001;49:271-8.
53. **Humphrey PA.** Gleason grading and prognostic factors in carcinoma of the prostate. **Mod Pathol** 2004;17:292-306.
54. **Humphrey PA.** Histological variants of prostatic carcinoma and their significance. **Histopathology** 2012; 60: 59-74.
55. **Jiang H, Xia D, Wu LJ, Chen ZD.** Inhibition of Bcl-2 enhances the efficacy of epirubicin chemotherapy in PC-3 prostate cancer cells. **Chinese Med J (Engl)** 2011;124:4018-21.
56. **Jiang J, Huang H.** Targeting the Androgen Receptor by Taxol in Castration-Resistant Prostate Cancer. **Mol Cell Pharmacol** 2010;2:1-5.
57. **Kasper S.** Identification, characterization, and biological relevance of prostate cancer stem cells from clinical specimens. **Urol Oncol** 2009;27:301-303.
58. **Kasper S.** Stem Cells: The Root of Prostate Cancer?. **Cell Physiol** 2008;216:332-336.
59. **Kim ED, Ignatoff JM.** Unsuspected bladder carcinoma in patients undergoing radical prostatectomy. **J Urol** 1994;152:397-400.
60. **Kristiansen G.** Diagnostic and prognostic molecular biomarkers for prostate cancer. **Histopathology** 2012;60:18-124.
61. **Lacher DA, Thompson TD, Hughes JP, Saraiya M.** Total, free, and percent free prostate-specific antigen levels among U.S. men, 2001-04. **Adv Data** 2006;379:1-12.
62. **Lang SH, Frame FM, Collins AT.** Prostate cancer stem cells. **J Pathol** 2009;217:299-306.
63. **Lee SO, Tian J, Huang CK, Ma Z, Lai KP, Hsiao H, Jiang M, Yeh S, Chang C.** Suppressor role of androgen receptor in proliferation of prostate basal epithelial and progenitor cells. **J Endocrinol** 2012;213:173-182.
64. **Leitzmann MF, Rohrmann S.** Risk factors for the onset of prostatic cancer: age, location, and behavioral correlates. **Clin Epidemiol** 2012;4:1-11.
65. **Letellier G, Perez MJ, Yacoub M, Levillain P, Cussenot O, Fromont G.** Epithelial phenotypes in the developing human prostate. **J Histochem Cytochem** 2007;55:885-90.
66. **Li J, Thompson T, Joseph DA, Master VA.** Association Between Smoking Status, and Free, Total and Percent Free Prostate Specific Antigen. **J Urol** 2012;187:1228-1233.
67. **Liao CP, Adisetiyo H, Liang M, Roy-Burman P.** Cancer stem cells and microenvironment in prostate cancer progression. **Horm Cancer** 2010;1:297-305.
68. **Liu AY, Roudier MP, True LD.** Heterogeneity in primary and metastatic prostate cancer as defined by cell surface CD profile. **Am J Pathol** 2004;165:1543-56.
69. **Long RM, Morrissey C, Fitzpatrick JM, Watson RW.** Prostate epithelial cell differentiation and its relevance to the understanding of prostate cancer therapies. **Clin Sci (Lond)** 2005; 108:1-11.
70. **Long RM, Morrissey C, Walsh S, Hamilton HJ, Farrell N, O'Neill A, Fitzpatrick JM, Watson WR.** Alterations in the expression of inhibitors of apoptosis during differentiation of prostate epithelial cell. **BJU Int** 2007;100:445-09.

71. **Lopez-Beltran A, Qian J, Montironi R, Luque RJ, Bostwick DG.** Atypical adenomatous hyperplasia (adenosis) of the prostate: DNA ploidy analysis and immunophenotype. **Int Surg Pathol** 2005;13:167-73.
72. **Lucan M, Vasiliu V, Iacob G, Lucan V.** Atypical ductal adenocarcinoma of the prostate with endometrioid immunohistological features. **Chirurgia (Bucur)**. 2009;104:355-8.
73. **Madani SH, Ameli S, Khazaei S, Kanani M, Izadi B.** Frequency of Ki-67 (MIB-1) and P53 expressions among patients with prostate cancer. **Indian J Pathol Microbiol** 2011;54:688-91.
74. **Maitland NJ, Frame FM, Polson ES, Lewis JL, Collins AT.** Prostate cancer stem cells: do they have a basal or luminal phenotype?. **Horm Cancer** 2011;2:47-61.
75. **Man YG, Gardner WA.** Bad seeds produce bad crops: a single stage-process of prostate tumor invasion. **Int J Biol Sci** 2008;4:246-48.
76. **Man YG, Zhao C, Chen X.** A subset of prostate basal cells lacks the expression of corresponding phenotypic markers. **Pathol Res Pract** 2006;202:651-62.
77. **Mao GE, Harris DM, Moro A, Heber D, Roy-Burman P, Zhang ZF, Rao J.** A joint effect of new western diet and retinoid X receptor alpha prostate-specific knockout with development of high-grade prostatic intraepithelial neoplasia in mice-A preliminary study. **Prostate** 2012;72:1052-1059.
78. **Mao GE, Reuter VE, Cordon-Cardo C, Dalbagni G, Scher HI, DeKernion JB, Zhang ZF, Rao J.** Decreased retinoid X receptor-alpha protein expression in basal cells occurs in the early stage of human prostate cancer development. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 2004;13:383-90.
79. **Marian CO, Yang L, Zou YS, Gore C, Pong RC, Shay JW, Kabbani W, Hsieh JT, Raj GV.** Evidence of epithelial to mesenchymal transition associated with increased tumorigenic potential in an immortalized normal prostate epithelial cell line. **Prostate** 2011;71:626-36.
80. **Martin P, Liu YN, Pierce R, Abou-Kheir W, Casey O, Seng V, Camacho D, Simpson RM, Kelly K.** Prostate epithelial Pten/TP53 loss leads to transformation of multipotential progenitors and epithelial to mesenchymal transition. **Am J Pathol** 2011;179:422-35.
81. **Mastropasqua MG, Pruneri G, Renne G, De Cobelli O, Viale G.** Basaloid cell carcinoma of the prostate. **Virchows Arch** 2003; 443; 787-91.
82. **Mazzucchelli R, Barbisan F, Santinelli A, Lopez-Beltran A, Cheng L, Scarpelli M, Montironi R.** Immunohistochemical expression of prostate tumor overexpressed 1 in cystoprostatectomies with incidental and insignificant prostate cancer. Further evidence for field effect in prostatic carcinogenesis. **Hum Pathol** 2011;42:1931-6.
83. **Mazzucchelli R, Barbisan F, Santinelli A, Lopez-Beltran A, Cheng L, Scarpelli M, Montironi R.** Immunohistochemical expression of prostate stem cell antigen in cystoprostatectomies with incidental prostate cancer. **Int J Immunopathol Pharmacol** 2009 ;22:755-62.
84. **McKenney JK, Amin MB, Srigley JR, Jimenez RE, Ro JY, Grignon DJ, Young RH.** Basal cell proliferations of the prostate other than usual basal cell hyperplasia: a clinicopathologic study of 23 cases, including four carcinomas, with a proposed classification. **Am J Surg Pathol** 2004; 28:1289-98.
85. **Mohler JL.** A role for the androgen-receptor in clinically localized and advanced prostate cancer. **Best Pract Res Clin Endocrinol Metab** 2008; 22:357-72.
86. **Molinié V, Baumert H.** New markers in prostate biopsies. **Actas Urol Esp** 2007;31:1009-24.



87. **Molinié V, Fromont G, Sibony M, Vieillefond A, Vassiliu V, Cochand-Priollet B, Hervé JM, Lebreton T, Baglin AC.** Diagnostic utility of a p63/alpha-methyl-CoA-racemase (p504s) cocktail in atypical foci in the prostate. **Mod Pathol** 2004;17:1180-90.
88. **Molinié V, Vieillefond A, Michiels JF; pour la commission prostate de l'AFAQAP.** Evaluation of p63 and p504s markers for the diagnosis of prostate cancer. **Ann Pathol** 2008; 28: 417-23.
89. **Montironi R, Mazzucchelli R, Lopez-Beltran A, Scarpelli M, Cheng L.** Prostatic intraepithelial neoplasia: its morphological and molecular diagnosis and clinical significance. **BJU Int** 2011;108:1394-401.
90. **Moro L, Arbin AA, Marra E, Greco M.** Constitutive activation of MAPK/ERK inhibits prostate cancer cell proliferation through upregulation of BRCA2. **Int J Oncol** 2007; 30:217-24.
91. **Moscатели D, Wilson EL.** PINning down the origin of prostate cancer. **Sci Transl Med** 2010;2:43ps38.
92. **Mostaghel EA, Solomon KR, Pelton K, Freeman MR, Montgomery RB.** Impact of circulating cholesterol levels on growth and intratumoral androgen concentration of prostate tumors. **PLoS One** 2012;7:e30062.
93. **Moul JW.** Angiogenesis, p53, bcl-2 and Ki-67 in the progression of prostate cancer after radical prostatectomy. **Eur Urol** 1999;35:399-407.
94. **Moul JW, Bettencourt MC, Sesterhenn IA, Mostofi FK, McLeod DG, Srivastava S, Bauer JJ.** Protein expression of p53, bcl-2, and Ki-67 (MIB-1) as prognostic biomarkers in patients with surgically treated, clinically localized prostate cancer. **Surgery** 1996;120:159-66.
95. **Nagao K, Yamamoto Y, Hara T, Komatsu H, Inoue R, Matsuda K, Matsumoto H, Hara T, Sakano S, Baba Y, Matsuyama H.** Ki67 and BUBR1 may discriminate clinically insignificant prostate cancer in the PSA range <4 ng/ml. **Jpn J Clin Oncol** 2011;41:555-64.
96. **Netto GJ, Epstein JI.** Widespread high-grade prostatic intraepithelial neoplasia on prostatic needle biopsy: a significant likelihood of subsequently diagnosed adenocarcinoma. **Am J Surg Pathol** 2006;30:1184-8.
97. **Nikoleishvili D, Perita A, Trsintsadze O, Gogokhia N, Managadze L, Chkhotua A.** Expression of p27(Kip1), cyclin D3 and Ki67 in BPH, prostate cancer and hormone-treated prostate cancer cells. **Int Urol Nephrol** 2008;40: 953-9.
98. **Okada H, Tsubura A, Okamura A, Senzaki H, Naka Y, Komatsu Y, Morii S.** Keratin profiles in normal/hyperplastic prostates and prostate carcinoma. **Virchows Archiv. A, Pathol Anat Histol** 1992; 421:157-61.
99. **Oliai BR, Kahane H, Epstein JI.** Can basal cells be seen in adenocarcinoma of the prostate?: an immunohistochemical study using high molecular weight cytokeratin (clone 34betaE12) antibody. **Am J Surg Pathol** 2002;26:1151-60.
100. **Oxley JD, Winkler MH, Parry K, Brewster S, Abbott C, Gillatt DA.** p53 and bcl-2 immunohistochemistry in preoperative biopsies as predictors of biochemical recurrence after radical prostatectomy. **BJU Int** 2002;89:27-32.
101. **Ozsoy O, Fioretta G, Ares C, Miralbell R.** Incidental detection of synchronous primary tumours during staging workup for prostate cancer. **Swiss Med Wkly** 2010;140:233-6.
102. **Parekh N, Lin Y, Dipaola RS, Marcella S, Lu-Yao G.** Obesity and prostate cancer detection: insights from three national surveys. **Am J Med** 2010;123:829-35.

103. **Peehl DM, Sellers RG, McNeal JE.** Keratin 19 in the adult human prostate: tissue and cell culture studies. *Cell Tissue Res* 1996;285:171-6.
104. **Placzek WJ, Wei J, Kitada S, Zhai D, Reed JC, Pellecchia M.** A survey of the anti-apoptotic Bcl-2 subfamily expression in cancer types provides a platform to predict the efficacy of Bcl-2 antagonists in cancer therapy. *Cell Death Dis* 2010;1:e40.
105. **Pradip K. Majumder, Chiara Grisanzio, Fionnuala O'Connell, Marc Barry, Joseph M. Brito, Qing Xu, sil Guney, Raanan Berger, Paula Herman, Rachel, Bikoff, Giuseppe Fedele, Won-Ki Baek, Shunyou Wang, Katharine Ellwood-Yen, Hong Wu, Charles L. Sawyers, Sabina Signoretti, William C. Hahn, Massimo Loda, William R. Sellers.** A prostatic intraepithelial neoplasia-dependent p27kip1 checkpoint induces senescence, inhibits cell proliferation and cancer progression. *Cancer Cell* 2008;14:146–155.
106. **Price RS, Cavazos DA, De Angel RE, Hursting SD, Degraffenried LA.** Obesity-related systemic factors promote an invasive phenotype in prostate cancer cells. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2012;15:135-143.
107. **Rai RS, Deb P, Rai R, Gupta E, Panayach JS.** Synchronous primary triple neoplasia (renal cell carcinoma and prostate cancer in combination with thyroid neoplasm). Report of an unusual case. *Min Urol Nefrol* 2007;59:451-4.
108. **Ricke WA, Ishii K, Ricke EA, Simko J, Wang Y, Hayward SW, Cunha GR.** Steroid hormones stimulate human prostate cancer progression and metastasis. *Int J Cancer* 2006;118:2123-31.
109. **Rizzo S, Attard G, Hudson DL.** Prostate epithelial stem cells. *Cell Prolif* 2005;38:363-74.
110. **Roobol MJ, Haese A, Bjartell A.** Tumour markers in prostate cancer III: biomarkers in urine. *Acta Oncol* 2011;50 (Suppl 1):85-9.
111. **Sakr WA, Partin AW.** Histological markers of risk and the role of high-grade prostatic intraepithelial neoplasia. *Urology* 2001;57(4 Suppl 1):115-20.
112. **Samaratunga H, Delahunt B.** Ductal adenocarcinoma of the prostate: current opinion and controversies. *Anal Quant Cytolol Histol* 2008;30:237-46.
113. **Sasaki H, Miki J, Hasegawa T, Hasegawa N, Ikemoto I, Ohishi Y.** Prostatic cancer in a young adult: a report of 2 cases. *Acta Urol Jpn* 2004;50:57-9.
114. **Satoh H, Momma T, Saito S, Hirose S.** A case of synchronous triple primary carcinomas of the kidney, bladder and prostate. *Acta Urol Jpn* 2003;49:261-4.
115. **Schemelz M, Moll R, Hesse U, Prasad AR, Gandolfi JA, Hasan SR, Bartholdi M, Cress AE.** Identification of a stem cell candidate in the normal human prostate gland. *Eur J Cell Biol* 2005; 84: 341-54.
116. **Sfaxi M, Miladi M, Bacha K, Zermani R, Chebil M, Ayed M.** Prostatic cancer in the young adult. *Prog Urol* 2003;13:313-5.
117. **Sfoungaristos S, Perimenis P.** Clinical and pathological variables that predict changes in tumour grade after radical prostatectomy in patients with prostate cancer. *Can Urol Assoc J* 2012;24:1-5.
118. **Shaikh Ibrahim Z, Ochsenfahrt J, Fuchs K, Wernert N.** Novel identification of the ETS-1 splice variants p42 and p27 in prostatecancer cell lines. *Oncol Rep* 2012;27:1321-4.

119. **Simak R, Capodieci P, Cohen DW, Fair WR, Scher H, Melamed J, Drobnjak M, Heston WD, Stix U, Steiner G, Cordon-Cardo C.** Expression on c-kit and kit-ligand in benign and malignant prostatic tissues. **Histol Histopathol** 2000; 15: 365-74.
120. **Singh RV, Agashe SR, Gosavi AV, Sulhyan KR.** Interobserver reproducibility of Gleason grading of prostatic adenocarcinoma among general pathologists. **Ind J Cancer** 2011;48:488-95.
121. **Stackhouse GB, Sesterhenn IA, Bauer JJ, Mostofi FK, Connelly RR, Srivastava SK, Moul JW.** p53 and bcl-2 immunohistochemistry in pretreatment prostate needle biopsies to predict recurrence of prostate cancer after radical prostatectomy. **J Urol** 1999;162:2040-5.
122. **Sternberg, Stephen S.** Histology for pathologists. Segunda edición. Lippincott-Raven Publishers. Philadelphia, New York.1997. Cap 42, pag.:997-1017.
123. **Tamburrino L, Salvianti F, Marchiani S, Pinzani P, Nesi G, Serni S, Forti G, Baldi E.** Androgen receptor (AR) expression in prostate cancer and progression of the tumor: Lessons from cell lines, animal models and human specimens. **Steroids** 2012;77:996-1001.
124. **Tanner MJ, Welliver RC Jr, Chen M, Shtutman M, Godoy A, Smith G, Mian BM, Buttyan R.** Effects of androgen receptor and androgen on gene expression in prostate stromal fibroblasts and paracrine signaling to prostate cancer cells. **PLoS One** 2011;6:e16027.
125. **Tavora F, Epstein JI.** High-grade prostatic intraepithelial neoplasia-like ductal adenocarcinoma of the prostate: a clinicopathologic study of 28 cases. **Am J Surg Pathol** 2008;32:1060-7.
126. **Tran CP, Lin C, Yamashiro J, Reiter RE.** Prostate stem cell antigen is a marker of late intermediate prostate epithelial cells. **Mol Cancer Res** 2002;1:113-21.
127. **Uchida K, Hoshina A, Nagano M, Matsumoto J, Kawamura J.** A case of asynchronous quadruple cancer arising from the prostate, stomach, rectum and urinary bladder. **Acta Urol Jpn** 1997;43:899-902.
128. **Uemura M, Nakagawa M, Kanno N, Nishimura K, Miyoshi S, Kawano K.** Endometrioid adenocarcinoma of the prostate: report of 3 cases. **Acta Urol Jpn** 2004;50:825-8.
129. **van Poppel H, Tombal B.** Chemoprevention of prostate cancer with nutrients and supplements. **Cancer Manag Res** 2011;3:91-100.
130. **van Leenders GJ, Aalders TW, Hulsbergen-van de Kaa CA, Ruiter DJ, Schalken JA.** Expression of basal cell keratins in human prostate cancer metastases and cell lines. **J Pathol** 2001;195:563-70.
131. **van Leenders GJ, Gage WR, Hicks JL, van Balken B, Aalders TW, Schalken JA, De Marzo AM.** Intermediate Cells in Human Prostate Epithelium Are Enriched in Proliferative Inflammatory Atrophy. **Am J Pathol** 2003;62: 1529-1537.
132. **Vander DJ, Karthaus WL, Dalrymple S, Meeker Alan, DeMarzo AM, Isaacs JT.** The role of CD133 in normal human prostate stem cells and malignant cancer-initiating cells. **Cancer Res** 2008;68: 9703-9711.
133. **Vis AN, Schröder FH.** Key targets of hormonal treatment of prostate cancer. Part 1: the androgen receptor and steroidogenic pathways. **BJU Int** 2009;104:438-48.
134. **Vlachostergios PJ, Karasavvidou F, Kakkas G, Kapatou K, Gioulbasanis I, Daliani DD, Moutzouris G, Papandreou CN.** Lack of prognostic significance of p16 and p27 after radical prostatectomy in hormone-naïve prostate cancer. **J Negat Results Biomed** 2012;11:2.

- 
135. **Waltering KK, Helenius MA, Sahu B, Manni V, Linja MJ, Jänne OA, Visakorpi T.** Increased expression of androgen receptor sensitizes prostate cancer cells to low levels of androgens. **Cancer Res** 2009;69:8141-9.
  136. **Wang Y, Sudilovsky D, Zhang B, Haughney PC, Rosen MA, Wu DS, Cunha TJ, Dahiya R, Cunha GR, Hayward SW.** A human prostatic epithelial model of hormonal carcinogenesis. **Cancer Res** 2001;61:6064-72.
  137. **Welsh M, Moffat L, Jack L, McNeilly A, Brownstein D, Saunders PT, Sharpe RM, Smith LB.** Deletion of androgen receptor in the smooth muscle of the seminal vesicles impairs secretory function and alters its responsiveness to exogenous testosterone and estradiol. **Endocrinology** 2010;151:3374-85.
  138. **Wermert N.** Immunohistochemistry of the prostate and prostate carcinomas. **Veroff Pathol** 1991;135:1-163.
  139. **Xie LP, Qin J, Zheng XY, Shen HF, Chen ZD, Cai SL, Zhang ZG, Ding W, Ren GP, Wang LJ, Yu XR.** Age and pathological features of 481 prostate cancer patients. **Natl J Androl** 2005;11:428-30.
  140. **Yang G, Goltsov AA, Ren C, Kurosaka S, Edamura K, Logothetis R, Demayo FJ, Troncoso P, Blando J, Digiovanni J, Thompson TC.** Caveolin-1 Upregulation Contributes to c-Myc-Induced High-Grade Prostatic Intraepithelial Neoplasia and Prostate Cancer. **Mol Cancer Res** 2012;10:218-29.
  141. **Yang XJ, Mc Entee M, Epstein JI.** Distinction of basaloid carcinoma of the prostate from benign basal cell lesions by using immunohistochemistry for Bcl-2 and Ki-67. **Hum Pathol** 1998;29:1447-50.
  142. **Zhao H, Nolley R, Chen Z, Reese SW, Peehl DM.** Inhibitor of monoamine oxidase A promotes secretory differentiation in basal prostatic epithelial cells. **Differentiation** 2008;76:820-30.
  143. **Zenzmaier C, Untergasser G, Berger P.** Aging of the prostate epithelial stem/progenitor cell. **Exp Gerontol** 2008;43:981-85.